

На правах рукописи

ПРАЗДНОВА ЕВГЕНИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**АНТИМУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОБИОТИКОВ КАК
ОСНОВА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Ростов-на-Дону
2020

Работа прошла апробацию в Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

Научный консультант: Чистяков Владимир Анатольевич, доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет».

Ведущая организация: Автономная научная некоммерческая организация высшего образования научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии»

Защита состоится «1» июня 2020 года в 12.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ 03.01.03.001, по адресу: 141701, г. Долгопрудный Московской обл., Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-biologicheskie-nauki.php>.

Работа представлена «24» января 2020 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п.3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

Согласно определению Всемирной организации здравоохранения, пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при ведении в адекватных количествах способны принести пользу эукариотическому организму (FAO/WHO, 2006). Чаще всего в качестве пробиотиков используются микроорганизмы родов *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *Bifidobacterium*, а также рода *Bacillus*.

В качестве основных механизмов, обеспечивающих положительное действие пробиотиков на организм хозяина рассматривают: 1) антагонизм с патогенной микрофлорой; 2) стимуляцию специфического и неспецифического иммунитета; 3) стимуляцию роста нормальной микрофлоры; 4) выделение пищеварительных ферментов; 5) продукция аминокислот и витаминов; 6) деструкция ксенобиотиков (аллергенов, мутагенов), а также веществ, затрудняющих усвоение пищи (Феоктистова и др, 2017; Savustyanenko et al, 2016). Отдельные работы свидетельствуют о том, что пробиотики оказывают влияние на психическое состояние хозяина (Petra et al, 2015), вмешиваются в регуляцию обмена веществ, работу гормональных систем (Zhou et al, 2019), экспрессию генов (Li et al, 2018) и другие регуляторные механизмы.

Метаболиты, выделяемые пробиотическими бактериями, такие, как, например, бактериоцины, могут рассматриваться как современная альтернатива антибиотикам (Priebe, 2002). Спектр данных метаболитов и их биологическая активность до сих пор остаются предметом изучения.

Постепенно накопились многочисленные факты о способности пробиотических микроорганизмов эффективно корректировать патологические проявления заболеваний, не связанных с инфекциями, в частности аллергий, токсикозов различной природы и др. (Vanderhoof, 2010). Такая неспецифическая стимулирующая активность может быть связана с выделением метаболитов, защищающих клетки хозяина от наиболее разрушительных последствий стресса – генерации активных форм кислорода и повреждения ДНК.

Оксидательный стресс лежит в основе действия самых разных экстремальных и патогенных факторов (Fridovich, 1999). Накопление модифицированных активных форм кислорода является причиной развития тяжелых нарушений процессов и структур, поддерживающих гомеостаз организма. Прооксиданты вызывают самый широкий спектр негативных эффектов – от острой токсичности до гибели клеток как по пути апоптоза, так и некроза, индукции летальных мутаций и гормональных нарушений. Процессы свободнорадикального окисления являются одной из движущих сил развития старения, а, следовательно, лежат в основе большинства возрастных патологий (Wells, 2005; Sedelnikova, 2010).

Повреждения ДНК и мутагенез, в том числе и не связанный с окислительным стрессом – еще более широкий аспект той же проблемы: с

этими явлениями связывают процесс старения, канцерогенез, возникновение иных нарушений гомеостаза. Кроме того, действие мутагенных факторов на микрофлору организма приводит к возникновению и накоплению в ней факторов резистентности к антибиотикам (Sirz et al, 2005).

Важность проблемы контроля уровня АФК и повреждения ДНК для стабильной работы всех систем организма определяет актуальность поиска живых организмов, способных вырабатывать антиоксиданты и ДНК-протекторы - в частности, среди пробиотических штаммов.

В данной работе была изучена биологическая активность ряда пробиотических штаммов *Lactobacillus* и *Enterococcus*, а также двух штаммов *Bacillus*: *B.subtilis KATMIRA1933* и *B. amyloliquefaciens B-1895*.

Цель и задачи работы.

Целью настоящего исследования было изучение спектра биологической активности пробиотических штаммов рода *Bacillus*, таких, как антимутагенное действие, ингибирование SOS-ответа в клетках других бактерий, влияния на экспрессию генов хозяина, а также механизмов, обеспечивающих пробиотические свойства.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Скрининг штаммов пробиотических микроорганизмов при помощи бактериальных Lux-биосенсоров на антиоксидантную, ДНК-протекторную, SOS-ингибирующую активности.

2. Исследование антимутагенных и др. свойств ферментатов пробиотических штаммов *B.subtilis* и *B. amyloliquifaciens*, в частности, оценка способности ферментатов, обладающих максимальной целевой активностью, подавлять развитие антибиотикорезистентности у клинических изолятов грамотрицательных и грамположительных патогенных бактерий.

3. Изучение системного действия пробиотических препаратов на основе этих штаммов (в смеси и по отдельности) на животных моделях: разработка способа замедления репродуктивного старения кур за счет введения в их рацион препаратов пробиотических бактерий рода *Bacillus*, способных выделять в культуральную среду вещества с антиоксидантной и ДНК-протекторной активностью.

4. Идентификация метаболитов, обеспечивающих данные эффекты.

Научная новизна. В результате проведенных исследований были впервые получены количественные параметры эффективности подавления ферментатами пробиотических бактерий индуцированного ципрофлоксацином SOS-ответа у штаммов Lux-биосенсоров *E.coli*. Был разработан оптимизированный протокол получения ферментатов пробиотических микроорганизмов с максимальной целевой активностью. Были получены количественные параметры снижения спонтанной и индуцированной частоты мутаций антибиотикорезистентности при действии ферментатов пробиотических микроорганизмов на клинические изоляты патогенных

бактерий. Было показано, что хроническое введение препарата, содержащего пробиотические бациллы, выделяющие комплекс природных антиоксидантов и ДНК-протекторов, не только стимулирует рост и яйценоскость продуктивной птицы, но и замедляет возрастное падение яйценоскости, а, следовательно, замедляет репродуктивное старение. Молекулярной основой такого замедления является стабилизация митохондриальной ДНК, но не замедление укорочения теломер. Физиологической основой, по-видимому, является влияние на экспрессию ядерных генов, как можно судить по изменению экспрессии гена вителлогенина. Впервые были идентифицированы метаболиты, обеспечивающие антимутагенную активность пробиотиков.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты проекта могут быть использованы как основа для создания новой группы функциональных продуктов для лечебного питания – ингибиторов мутагенеза патогенных микроорганизмов. Данные продукты призваны стать важным инструментом для реализации комплексной стратегии борьбы с развитием устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам. Ее внедрение позволит обеспечить высокую эффективность лечения инфекционных заболеваний бактериальной природы, даже в условиях глобальной тенденции потери эффективности антимикробных препаратов. Результаты, полученные в ходе экспериментов на животных, открывают путь к созданию семейства пробиотических препаратов нового поколения, действие которых направлено на получение спектра системных полезных эффектов через стабилизацию митохондриального генома и влияние на экспрессию генов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Пробиотические бактерии выделяют метаболиты с антимутагенной активностью и способностью ингибировать SOS-ответ у бактерий.
2. Данные метаболиты у представителей рода *Bacillus* обладают термостабильностью и устойчивостью к действию протеиназ и РНКаз, имеют пептидную природу и небольшие размеры.
3. Прием препаратов, основанных на штаммах с данной активностью, приводит к системным биологическим эффектам, таким, как замедление репродуктивного старения.
4. Механизм данного эффекта основан на защите митохондриальной ДНК от повреждений и влиянии на экспрессию ядерных генов, и не связан с изменением длины теломер.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были доложены и обсуждены на следующих конференциях: VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) г. Ростов-на-Дону, 15–20 июня 2014 г; IX международной научной конференции аспирантов и студентов, Донецк: ГУВЗ "ДонНТУ", 2015; VI Международная научно-практическая конференции

«Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». г. Ростов-на-Дону, 1–3 октября 2015; XIV Курчатовская молодежная научная школа (8 - 11 ноября 2016 г.); 7th Singapore Health & Biomedical Congress (24-26 сентября 2016, Сингапур); The Tenth International conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems biology (BGRS\SB-2016) Novosibirsk, Russia 29 August – 2 September, 2016; V международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» 25-29 сентября 2017 года; Научно-практической конференции с международным участием (Ростов-на-Дону, 2–4 ноября 2017 г.) "Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции". – Р-н-Д., 2017.; XVIII Всероссийская конференция молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», г. Москва, 19-20.04.2018; V Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» 7-21 сентября 2018 г., г. Ялта; Международная научно-практическая конференция «Инновационные направления в кормлении сельскохозяйственной птицы» 6-7.06.2018, г. Волгоград.

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 38 работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК РФ - 19 статей, получены 9 авторских свидетельств о РИД.

Объем и структура диссертации. Работа выполнена на 266 страницах, включает 5 разделов и состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и выводов.

Финансовая поддержка. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (проекты № 19.6015.2017/8.9, БЧ 0110-11/2017-23), РНФ (проект № 16-16-04032), фонда грантов Президента РФ (проект МК-5950.2018.4).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Биосенсорные штаммы. В работе использовали рекомбинантные штаммы *E.coli* (MG 1655 (pSoxS-lux), MG1655 (pKatG-lux), MG1655 (pRecA-lux), MG1655 (pColD-lux)), содержащие плазмиды с опероном luxCDABE фотобактерии *Photorhabdus luminescens*, поставленным под контроль соответствующих промоторов *E. coli*. Данный оперон содержит гены люциферазы и их регуляторы и обеспечивает биолюминесценцию, используемую в данном тесте в качестве репортерной функции. Биосенсорные штаммы получены из коллекции ГосНИИ Генетика, Москва.

Биосенсоры с промоторами PkatG и PsoxS фиксируют наличие в среде окислителей, образующих в клетке соответственно гидроперекиси и супероксид-анион-радикал. Биосенсоры с плазмидами pRecA, pColD фиксируют наличие в клетке факторов, вызывающих повреждение ДНК. Основным отличием в работе промоторов PrecA и Pcda (из плазмиды pColD) является наличие фоновой активности PrecA при нормальном метаболизме, без SOS-индукции, поскольку продукт регулируемого им гена - белок RecA – необходим для нормального протекания процесса репликации хромосомы. Продукт же гена ColD, колицин, необходим клеткам только в стрессовых условиях, выделяясь во внешнюю среду в качестве киллера (Zavilgelsky et al, 2007; Котова и др., 2009).

Пробиотические штаммы.

B. subtilis KATMIRA1933, была выделена из молочного продукта под торговым названием Yogi Farm, и невольно потреблялась людьми в течение многих лет без вредных последствий. Штамм производит противомикробные белки, в том числе субтилизин А (Sutyak, 2008).

Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 был выделен в Исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов, г. Москва (Karlyshev et al, 2005). Геномный анализ показал, что штамм несет гены синтеза протеолитических ферментов, антибиотического пептида субтилина, бацитрацин-подобного антибиотика, а также гены резистентности к фторхинолонам, тетрациклином, лантибиотикам. Размер генома составляет 4107280 п.н., содержание Г+Ц 46,2%, 4118 генов, кодирующих белок. Штамм используется в качестве пробиотика у осетровых (Golovko, 2008). Пробиотические свойства B-1895 г. проявились в стимуляции роста и устойчивости к патогенам рыб и птиц (Chistyakov, 2015). Включение *B. amyloliquefaciens* B 1895 г. в корма птицы повысило их иммунитет к вирусу Ньюкасла и увеличило вес тела птиц (Molnar, 2011; Chistyakov, 2015).

Штаммы *Lactobacillus* были получены из коллекции лаборатории экспериментального мутагенеза, а ранее выделены из естественной микрофлоры экспериментальных животных.

Методы исследования.

Скрининг при помощи биосенсорного теста. Был использован протокол биолюминесцентного теста, описанный в работе (Praznova et al, 2015). В качестве индуктора для активации SOS-ответа использовался раствор ципрофлоксацина (pharmaceutical grade, KRKA, Slovenia) в деионизированной воде в концентрации 10^{-4} мг/мл. В качестве индуктора повреждений ДНК использовали 1,4-диоксид 2,3-хиноксалиндиметанол (диоксидин) («Биосинтез», Россия) в концентрации $2,25 \cdot 10^{-5}$ М, для индукции окислительных повреждений – перекись водорода (Ferrain) в концентрации 10^{-3} М и паракват ($1,1'$ -диметил- $4,4'$ -дипиридилий дихлорид). Данное соединение провоцирует окислительный стресс, переключая работу клеточной биоэнергетики на генерацию супероксид-аниона вместо синтеза АТФ (Gutiérrez et al, 1996; Miller et al, 2007).

Культуры клеток *E. coli* растили на полноценной среде Луриа-Бертани (LB). Как в жидкую, так и твердую среду добавляли антибиотик ампициллин (100 мкг/мл).

Культивирование бактерий в жидкой питательной среде проводили при 37°C до ранней или средней логарифмической фазы. Ночную культуру разбавляли свежей средой до плотности 0,01 - 0,1 единица Мак-Фарланда (концентрация $3 \cdot 10^7$ - $3 \cdot 10^6$ клеток/мл). Измерения плотности проводились при помощи денситометра DEN-1B («Biosan»). Затем суспензию подращивали в течение 2 до ранней логарифмической фазы. Аликвоты этой культуры (по 90 мкл) переносили в стерильные ячейки (находящиеся в стрипах планшета) и добавляли в них по 10 мкл тестируемого препарата (кроме контрольных ячеек). В контрольные ячейки добавляли 10 мкл деионизированной воды.

После обработки планшет с пробами помещали в люминометр и инкубировали при 30°C . Интенсивность биолюминесценции измерялась каждые 10 - 15 мин.

Для измерений люминесценции использовался микропланшетный люминометр LM-01T (Immunotech co.). Все эксперименты проводили в трех независимых повторностях.

Фактор индукции SOS ответа/окислительного стресса/повреждения ДНК (I^s) вычисляли по формуле:

$$I^s = \frac{L_e}{L_k} - 1 \quad (1)$$

где: L_k – интенсивность люминесценции контрольной пробы (в условных единицах);

L_e – интенсивность люминесценции опытной пробы (в условных единицах).

Признаком статистической значимости эффекта SOS-индукции считали статистически значимое превышение L_e над L_k , оцениваемое по t-критерию.

Показатель протекторной активности (A, %) вычисляли по формуле:

$$A = (1 - \frac{I_a}{I_p})100\% \quad (2)$$

где: I_a – фактор индукции SOS-ответа исследуемым воздействием в присутствии ингибитора.

I_p - фактор индукции SOS-ответа ципрофлоксацином.

Все эксперименты проводили в трех независимых повторностях.

Среднее квадратичное отклонение факторов индукции S вычисляли по формуле:

$$s_I = \bar{I} \times \sqrt{\left(\frac{s_{I_e}}{I_e}\right)^2 + \left(\frac{s_{I_k}}{I_k}\right)^2} \quad (3)$$

где индексы e и k относятся к опыту и контролю, соответственно.

Культивирование пробиотических лактобактерий и получение ферментатов. В пробирку с 10 мл среды вносили петлей культуру лактобацилл и культивировали в течение двух суток при температуре 37°C. Затем путем добавления 0,1 mM раствора NaOH корректировали кислотность (pH) проб до 7.0.

Ферментат, лишенный клеток, получали путем центрифугирования культуры бацилл (Minispin-plus; Eppendorf, Leipzig, Germany) в течение 7 минут при скорости 6000 оборотов в секунду. Количество клеток оценивали при помощи денситометра DEN-1B (Biosan), а также путем посева на агаризованную среду MRS.

Культивирование пробиотических бацилл. Два штамма бацилл *Bacillus subtilis KATMIRA 1933* и *Bacillus amyloliquifaciens* B-1895 выращивали в течение суток в жидкой среде LB (Luria-Bertani) в термостате при температуре 37°C. Супернатант, лишенный клеток, был получен методом, описанным выше.

Все работы с микроорганизмами проводились в соответствии с СП 1.2.731-99 и ГОСТ Р 51446-99 (ИСО7218-96).

Измерение активности ферментатов. Делали ряд разведений супернатанта, полученного методом, описанным выше, после чего он добавлялся в планшет для измерения в количестве 10 мкл на ячейку. Для проверки термоустойчивости пробирки с супернатантом прогревали в течение 5, 15, 30 и 45 минут на водяной бане при 85 градусах Цельсия. Для предварительной проверки химической природы действующего вещества в супернатант добавляли протеиназу K в концентрации 10 мг/мкл (Синтол) и РНКазу 10 ед/мкл (Синтол) и выдерживали 30 минут перед добавлением в планшет и началом измерений.

Выделение фракций метаболитов проводили с помощью ионообменной хроматографии на жидкостном хроматографе низкого давления "BioLogic LP system" (Bio-Rad Laboratories, США). Градиент соли создавался с помощью 1M NaCl. Использовалась хроматографическая колонка "Q"(ООО "Техносорбент", Россия) 15,5·0,8 см.

Пробу предварительно фильтровали через стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,22 микрона, и разбавляли путем добавления стартового буфера (Трис 0,025 М, pH8,7). Полученные фракции исследовали на наличие целевой активности в серии биолюминесцентных тестов.

Масс-спектрометрический анализ

Протеомный анализ осуществляли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLC nano («ThermoScientific», США) соединенной с масс-спектрометром Q-exactiveHFx («ThermoScientific», США). Один микрограмм пептидной смеси загружали на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0,5 мм x 3 мм, размер частиц 5 мкм, ThermoScientific) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изографическом режиме с использованием буфера «С» в качестве подвижной фазы (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиной кислоты в деионизованной воде). Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ колонке AcclaimPepmap® C18 (75 мкм x 150 мм, 2 мкм размер частиц) («ThermoScientific», США) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% муравьиной кислоты) и подвижной фазой Б: (80% ацетонитрил, 0,1% водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 4 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 45 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 5 мин, после 10 минутной промывки при 99% буфера Б, концентрацию этого буфера линейно снижали до исходных 2% за 6 мин. Общая длительность анализа составляла 70 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-ExactiveHF в режиме положительной ионизации с использование источника NESI («ThermoScientific», США). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2.1 кВ, температура капилляра 240°C. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 350 m/z до 1500 m/z , при разрешении 120,000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически исходя из массы прекурсора, но не более 2000 m/z . Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как не более 40, при этом граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа бала установлена как 50000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от $z = 2^+$ до $z = 6^+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали 1×10^6 и 2×10^5 , соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS анализа на 90 с.

Анализ осуществлялся в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича", ЦКП «Протеом человека».

Определение частоты спонтанного и индуцированного мутагенеза. В качестве индукторов мутагенеза были использованы препараты диоксидин,

циплатин и фурацилин в концентрациях, подобранных на основании биосенсорного теста на генотоксичность. Для всех микроорганизмов применяли нижеописанный протокол.

Ночную культуру исследуемого микроорганизма растили в термостате при 37°C в присутствии индуктора (мутагена) в течение 18-20 часов.

В пробирку вносили: в контроль - 900 мкл среды LB, 100 мкл стерильного физраствора, в опыте: 900 мкл среды, 100 мкл раствора индуктора в стерильном физрастворе в нужной концентрации. В подготовленные таким образом пробирки вносили культуру с чашки (1 мазок петлей).

На 2 день культуру штаммов разводили свежей LB до 1-2 единиц Мак-Фарланда ($3\cdot6\cdot10^8$ КОЕ). Оптическую плотность раствора измеряли при помощи денситометра DEN-1B. Затем готовили ряд последовательных разведений культуры в физрастворе 1:10 (принимая исходную культуру за 1).

Производили поверхностный посев 100 мкл культуры на чашки с агаризованной LB с добавлением и без добавления антибиотика согласно стандартной методике (Семина и др. 2004). Подсчет колоний производили через 48 часов.

Диапазоны концентраций антибиотиков и индукторов:

Рифамицин: 10-100 мкг/мл

Ципрофлоксацин: 0,04 - 0,08-0,12 мкг\мл

Азитромицин: 64 мкг/мл

Изониазид: 100 мкг/мл

Диоксидин: $2,25\cdot10^{-5}$ М

Цисплатин: 25-50 мкг/мл

Фурацилин: 10 мкг/мл

Выживаемость считали по формуле:

$$\text{Выживаемость, \%} = \frac{n_{\text{опыт}}}{n_{\text{контроль}}} \cdot 100\% \quad (4),$$

где $n_{\text{опыт}}$ - число колоний после инкубирования с индуктором, $n_{\text{контроль}}$ - число колоний после инкубирования без индуктора.

Частоту мутантов считали по формуле:

$$\text{Частота} = \frac{n_{\text{опыт}}}{n_{\text{контроль}}} \quad (5),$$

где $n_{\text{опыт}}$ - число колоний на среде с антибиотиком, $n_{\text{контроль}}$ - число колоний на среде без антибиотика.

Антимикробная активность исследованных штаммов *Bacillus*.

Бесклеточные супернатанты пробиотических штаммов были приготовлены в соответствии с работой Sutyak и соавт. (2008). Плотность культуры доводили до $1\cdot10^6$ КОЕ/мл. Бесклеточные супернатанты (120 мкл.) от *B. subtilis* KATMIRA1933 и B-1895 помещали в отверстие в агаре диаметром 5мм в троекратной повторности. Штаммы-антагонисты наносили на чашки методом поверхностного посева. Чашки инкубировались в течение пяти дней при 37 °C (анаэробные штаммы – в бескислородной камере), после чего был измерен диаметр зон подавления культуры бактерий в миллиметрах.

Антибиотикоустойчивость исследованных бацилл

Ночную культуру штаммов доводили до 10^6 КОЕ/мл. Диско-диффузионный тест был произведен в соответствии с Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (CLSI, 2012). Использованные антибактериальные диски включали ампициллин (10 мкг.), эритромицин (15 мкг.), и тетрациклин (30 мкг.) из Becton Dickinson and Company (Спаркс, Мэриленд, США), в то время как бацитрацин (10 мкг.), хлорамфеникол (30 мкг.), канамицин (30 мкг.), пенициллин (10 АЕ), стрептомицин (10 μg) и окситетрациклин (30 μg) были получены из Benex Limited (Shannon, Co.). Чашки были инкубированы в течении 24 ч. при 37°C. Радиусы подавления были измерены в миллиметрах при помощи цифрового измерителя (Fischer Scientific, Питтсбург, Пенсильвания, США) от края диска до края зоны подавления.

Тест обратных бактериальных мутаций (Эймса)

Оценка мутагенности субтилозина, БКС *B. subtilis KATMIRA1933* и *B. amyloliquefaciens B-1895* была произведена в соответствии с протоколами Марона и Эймса (Maron, Ames, 1983), Капучино и Шермана (Capuccino, Sherman, 2008) с незначительными модификациями на *Salmonella typhimurium K-6 TA1535*. Частота мутаций измерялась для тестовых образцов. Частота мутаций вычислялась как число колоний ревертантов в обработанных чашках, деленное на их число в негативном контроле.

$$MF = \frac{NT}{NC} \quad (6)$$

Где MF – частота мутаций, NT – число ревертантов в обработанных образцах, NC – число ревертантов в контрольной чашке.

Результаты были оценены следующим образом: субстанция считается мутагенной, если число $MF \geq 2$, возможным мутагеном при значении от 1.7 до 1.9, и не мутагенным, если частота лежит в диапазоне $\leq 1 - 1.6$ (Kirkland, 2008).

Анализ экспрессии генов у кур. Для выделения использовали выделенную из тканей печени РНК 10 кур и 6 петухов возрастом 570 дней.

Для анализа транскрипционной активности генов выделенную РНК, сначала обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США), затем проводили реакции обратной транскрипции с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). В качестве отрицательного контроля обратной транскрипции для каждого образца использовали ту же реакционную смесь, но с добавлением воды вместо фермента (MMLV). Смесь инкубировали 60 минут при 39 °C и затем останавливали реакцию прогреванием смеси при 75°C в течение 10 минут. Полученную в ходе реакции обратной транскрипции кДНК использовали для дальнейшего ПЦР анализа. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием разработанных нами праймеров (табл. 1) и набора реактивов с интеркалирующим красителем Eva Green (Синтол, Россия) на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) по следующей программе: начальная денатурация при 95 °C в течение 3 мин., затем 35 циклов, включающих денатурацию при 95 °C – 15 сек., отжиг при 60°C – 25 сек. и элонгацию при 72 °C – 30 сек. Праймеры были специфично подобраны к

нуклеотидным последовательностям генов (таблица 1), полученных из базы данных NCBI.

Таблица 1. Праймеры для анализа относительной экспрессии.

Н ен	CBI Gene ID	N Последовательн ость прямого праймера (5'-3')	Последовательн ость обратного праймера (5'-3')	Раз мер аммикона (п.н.)
Гены синтеза вителлогенина				
<i>tg1</i>	4 24547	ACATGCTACT CCGTTGACCC	TCTGCCATTTC CAACAGGCTT	12 7
<i>tg2</i>	4 24533	AAATGCCGTG AGCTTGGTC	CTTGGAAATCA ACACCCGCCA	12 4
<i>tg3</i>	4 24534	GCAGTGAGTT TTGCTCAGTCC	CAGCCTTCTG CACAGCGTAA	16 1
Референсные гены				
<i>ctb</i>	3 96526	TGCCTCTAGC TCTTCCCTGG	CCACAGGACT CCATACCAA	12 9
<i>apdh</i>	3 74193	TGAGCTGAAT GGGAAGCTTACTG	CATCATACTT GGCTGGTTCTCCA	10 4
<i>af2</i>	4 28389	GCCATGGCTC TTCTGAGAGAT	AGAGTTGGCT AGGGCATCAA	15 0
<i>af4</i>	4 19223	CCAACTTGAC TGCATTAGCTGC	TCGCGTAAAC TGTCTGGTTGT	14 6

В анализ включили 4 референсных гена: *actb*, *gapdh*, *taf2*, *taf4*. Анализ относительного уровня экспрессии проводили, используя стандартный метод ΔCt , согласно формуле:

$$R = 2 \times E^{-\Delta Ct} \quad (7),$$

где ΔCt это разница между геном интереса и референсным геном, а Е, эффективность ПЦР. Нормализацию уровня экспрессии всех генов интереса (*vtg1*, *vtg2*, *vtg3*) проводили по среднему геометрическому значение всех референсных генов. Эффективность ПЦР определяли путем построения калибровочной кривой. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ R Sudio v. 1.0.136. В большинстве исследуемых групп полученные значения не соответствовали нормальному распределению, поэтому для статистической оценки различий использовали U-критерий Манна-Уитни. Был проведен анализ транскрипционной активности генов *vtg1*, *vtg2*, *vtg3* у контрольной и трех опытных групп кур возрастом 570 дней. В каждой группе исследовали РНК у 12 особей.

Оценка длины теломер. Проведено исследование длины теломерных участков хромосом в клетках крови у контрольной и трех опытных групп кур в различные временные периоды эксперимента: 75, 225 и 445 дней. В каждой группе исследовали ДНК 50 особей. Анализ относительной длины теломер

проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени в 3-х повторностях. Для количественного анализа длины теломер использовали два однокопийных участка – *gapdh* и *rplp0*. Дизайн специфичных праймеров (прямой – 5'-TCGGACCTGAGAAGACCTCC, обратный – TTCAATGGTCCCTCGGGAAA-3') к нуклеотидной последовательности гена *rplp0*, был проведен с помощью программы Primer-BLAST. Эффективность амплификации теломерных участков хромосом рассчитывали по калибровочной кривой, построенной на основе количественного анализа ПЦР продуктов (пороговых циклов) с различными концентрациями ДНК матрицы. В качестве ДНК матрицы был выбран синтетический олигонуклеотид, комплементарный по нуклеотидному составу теломерному участку хромосом (TTAGGG)₁₄. Исходя из эффективности ПЦР, вносили корректировку в формулу количественных расчетов:

$$2^{(\Delta Ct)}, \text{ где } \Delta Ct = 1.3 * Ct_{\text{теломер}} - (Ct_{\text{gapdh+rplp0}})/2 \quad (8)$$

Количественный анализ повреждений митохондриальной (мтДНК) и ядерной (ядНК) ДНК проводили путем относительной количественной оценки длинных (более 10 т.п.н.) ПЦР продуктов (по конечной точке) с последующей поправкой на уровень копийности митохондриальной или ядерной ДНК (Santos, 2002). Данный метод был модифицирован применительно к крови кур. Были подобраны оптимальные протоколы выделения ДНК, условия проведения ПЦР, проведен дизайн праймеров (прямой 5-ACCTTAGCCATCATCCCCCT-3 и обратный 5-GGGTTGGGTTGTCGACTGAA-3). Для определения информативности методики мы использовали перекись водорода в качестве индуктора активных форм кислорода *in vitro*. Эксперименты показали, что при действии 50 мкМ перекиси водорода разработанный метод позволяет регистрировать возникновение (0.95±0.3 повреждений в ПЦР-продукте размером 5061 п.н. и 1.09±0.3 в ПЦР-продукте размером 10070 п.н.). Таким образом, данная методика достаточно информативна для определения количества повреждений митохондриальной ДНК, вызываемых активными формами кислорода. Было проведено предварительное исследование влияния возраста птиц на уровень стабильности митохондриальной ДНК. В качестве материала для реализации данной задачи использовали полученную ранее ДНК (концентрация 5 нг/мкл) птиц трех возрастных групп (76, 330 и 458 суток). Были количественно определены короткие (271 п.н.) и длинные (10070 п.н.) ПЦР-продукты. Для каждой ПЦР реакции использовали одинаковое количество ДНК (10 нг). Следует отметить, что метод флуориметрической оценки содержания ДНК в растворе позволяет измерить только концентрацию общей ДНК – ядерной и митохондриальной. Поэтому для каждого образца число коротких ПЦР-продуктов использовали в качестве внутреннего стандарта копийности мтДНК, связи с чем, первичные значения концентраций длинных ампликонов нормализовали по числу коротких фрагментов с учетом эффективности реакций.

В результате были получены следующие нормализованные концентрации длинных ПЦР-продуктов: 76 суток – 51.3±13.9 нг/мкл, 330 суток – 20.4±2.8

нг/мкл и 458 суток – 22.7 ± 4.8 . Следовательно, наименьшее количество повреждений мтДНК выявлено у птиц возрастом 76 суток, а наибольшее – возрастом 330 суток. Следует подчеркнуть, что различия между значениями показателя для группы 76 суточных птиц и группами 330 и 458 суточных птиц статистически значимы, тогда как различия в количестве повреждений мтДНК у 330- и 458-суточных птиц находятся в пределах статистической погрешности. Таким образом, методика определения стабильности ДНК с помощью количественной ПЦР достаточно информативна для определения возрастных изменений показателя, однако с ограничением на поздних стадиях онтогенеза.

Повреждения в яДНК анализировали, как и в мтДНК, за исключением количества циклов лонг ПЦР – 31 (на один больше, чем в случае мтДНК) и праймеров (прямой гена *gapdh* (5'- САТСАААТГГГСГГАТГСАГ-3') и обратный 5'-СТГТГГГГТТГГСАСААААГ-3'). Размеры полученных ампликонов были схожи 10040 п.н. (мтДНК) и 10070 п.н. (яДНК). Для оценки копийности яДНК использовали данные ПЦР-РВ для гена *gapdh*, полученные при исследовании относительной длины теломер.

В качестве образца сравнения использовали средние значения концентраций ПЦР продуктов ДНК из клеток крови суточных цыплят, которые составили 64 (мтДНК) и 52 (яДНК) нг\мкл. Относительную количественную оценку повреждений в мтДНК и в яДНК рассчитывали по формулам $-\ln(X/64)$, где X значение концентрации (нг\мкл) ампликонов 10040 п.н. и $-\ln(Y/52)$, где Y значение концентрации (нг\мкл) ампликонов 10070 п.н., соответственно.

Анализ гематологического и биохимического составов крови подопытной птицы проводили в соответствии со стандартными методиками (Методические указания..., 1981; Карпищенко, 2012).

Статистическая обработка данных. Статистическую значимость отличий в биосенсорном тесте определяли по t-критерию Стьюдента для независимых выборок при $p < 0,05$. Достоверность мутагенного эффекта оценивали по статистической значимости отличий (t-тест $p < 0,05$) по числу колоний между опытом и контролем с учетом разведения. Статистическую обработку данных ПЦР проводили с использованием пакета программ R Sudio v. 1.0.136 <https://www.rstudio.com/>. Для статистической оценки различий использовали U-критерий Манна — Уитни. Оборудование для проведения исследований было подвергнуто поверке в органах Госстандарта РФ.

Результаты и их обсуждение

Скрининг штаммов пробиотиков с помощью бактериальных биосенсоров.

Изучена способность ферментатов пробиотических бактерий и дрожжей ингибировать SOS-ответ у бактерий. Из 9 изученных ферментатов пробиотических бактерий 8 демонстрируют способность ингибировать SOS-ответ у бактерий. Наиболее высокие значения ингибирующей активности обнаружены у *Lactobacillus sp.* 6367 (58,71 %) и двух штаммов *Bacillus* (50,84%

- 54,21%). Ферментаты пробиотических дрожжей также демонстрируют SOS-ингибирующую активность, но в меньшей степени (в среднем 20,33-28,35%).

Для дальнейших работ были выбраны штаммы *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. Были изучены бактерицидная, антигенотоксическая, антиоксидантная активности бесклеточных супернатантов данных штаммов. Показана их способность подавлять жизнедеятельность патогенных штаммов *Streptococcus intermedius* F0413, *Porphyromonas gingivalis* 381, 33277, W83, A7A1-28. Протестирована чувствительность штаммов бацилл к антибиотикам. Результаты показали, что штамм *B. subtilis* KATMIRA1933 восприимчив к бацитрацину и стрептомицину, и более чувствителен к пенициллину, ампициллину и хлорамфениколу, по сравнению с прочими исследованными антибиотиками. Устойчивость штамма *B. amyloliquefaciens* B-1895 к бацитрацину, стрептомицину, тетрациклину и окситетрациклину была выше, чем к другим антибиотикам, причем наибольшей была чувствительность к ампициллину и хлорамфениколу.

Показано, что ферментаты обоих штаммов *Bacillus* демонстрируют ДНК-протекторную и антиоксидантную (супероксидудастряющую) активность (до 60,19%).

SOS-ингибирующая активность.

Была изучена анти-SOS активность 9 штаммов пробиотических бактерий *p. Lactobacillus*, *Enterococcus* и *Bacillus*. В таблице 2 представлены обобщенные данные о способности метаболитов исследованных штаммов подавлять SOS-ответ, где значение анти-SOS активности экстракта выражено в процентах от целого.

Было установлено, что:

- шесть ферментатов культур лактобацилл и энтерококков (*L. rhamnosus*, *L. lactis* 6453, *Enterococcus durans* 6367, *L. acidophilus* 2647, *E. durans* 6379, *L. plantarum* B3242) показали наличие потенциальных антимутагенных свойств;

- метаболиты культуры *Enterococcus durans* 6367 (среднее значение протекторного эффекта 58.71%) обладают наиболее высокими показателями протекторной активности;

Один из семи штаммов лактобацилл (*Lactobacillus* M., данные не приведены) выделяет метаболиты, вызывающие индукцию SOS-ответа, поэтому не рассматривался в качестве ингибитора SOS-мутагенеза.

Была также изучена способность метаболитов двух штаммов, *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 и *Bacillus subtilis* KATMIRA1933, подавлять SOS-ответ у бактерий. Типичная кривая для этой серии экспериментов с протекторным эффектом ферментатов *Bacillus* показана на рисунке 1. Можно увидеть, что биолюминесценция *E. coli* MG1655 RecA-lux заметно снижается после введения жидкой культуры бацилл по сравнению с индукцией ципрофлоксацином.

Таблица 2. АнтиSOS активность метаболитов культур *Lactobacillus* и *Enterococcus*. Б/э – бактерицидный эффект.

Экстракт	АнтиSOS активность (Rec), %						
Объемная доля в растворе, %	0,000 01	0,000 1	0,001	0,01	0,1	1	10
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	53,11	64,39	51,66	64,51	63,42	62,39	51,49
<i>L. lactis</i> 6453	23,95	17,89	33,89	35,21	31,26	19,39	41,92
<i>Enterococcus durans</i> 6367	69,08	60,26	64,80	66,61	63,86	76,31	63,62
<i>L. acidophilus</i> 2647	48,36	46,83	48,16	40,83	53,18	53,30	Б/э
<i>Enterococcus durans</i> 6379	59,21	54,22	50,19	54,14	56,97	57,31	63,08
<i>L. plantarum</i> B3242	33,50	78,27	44,99	46,30	75,21	60,62	Б/э

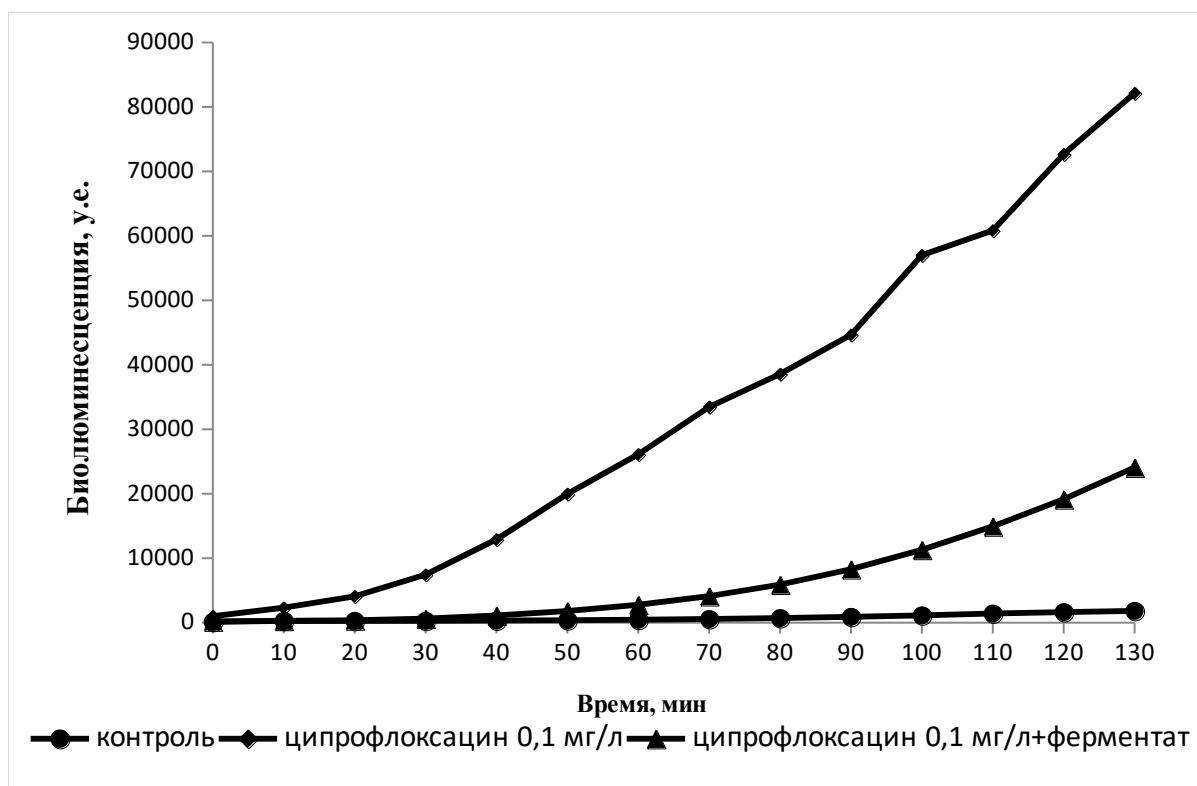


Рисунок 1. Индукция *E.coli* MG 1655 RecA-lux в присутствии ципрофлоксацина с ферментатом *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 и без него.

Увеличение дозы ферментата также коррелирует с усилением протекторного эффекта (рисунок 2). По сравнению с протекторным эффектом, который наблюдался у штамма *Bacillus subtilis* KATMIRA1933, супернатант штамма *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 более устойчив к разведению и показывает ингибирование SOS-активности даже при разбавлении в 10 000 раз.

Как можно видеть из представленных данных, ферментаты обоих штаммов *Bacillus* продемонстрировали SOS-ингибирующую активность (до 54,21%) и способность снижать SOS-ассоциированный мутагенез у бактерий. При этом штамм K1933 характеризовался более высокой протекторной активностью.

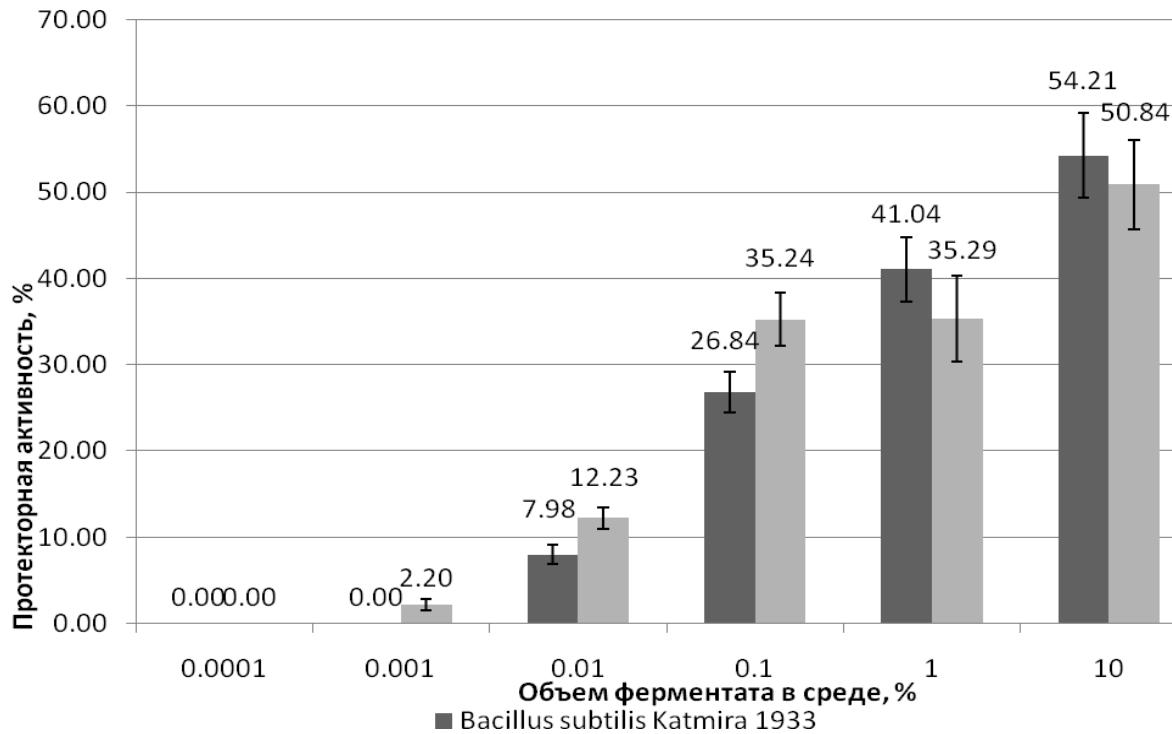


Рисунок 2. Анти-SOS-активность ферментатов бацилл.

Ферментаты также подвергли воздействию температуры и ферментов - протеиназы К и РНКазы (рисунок 3).

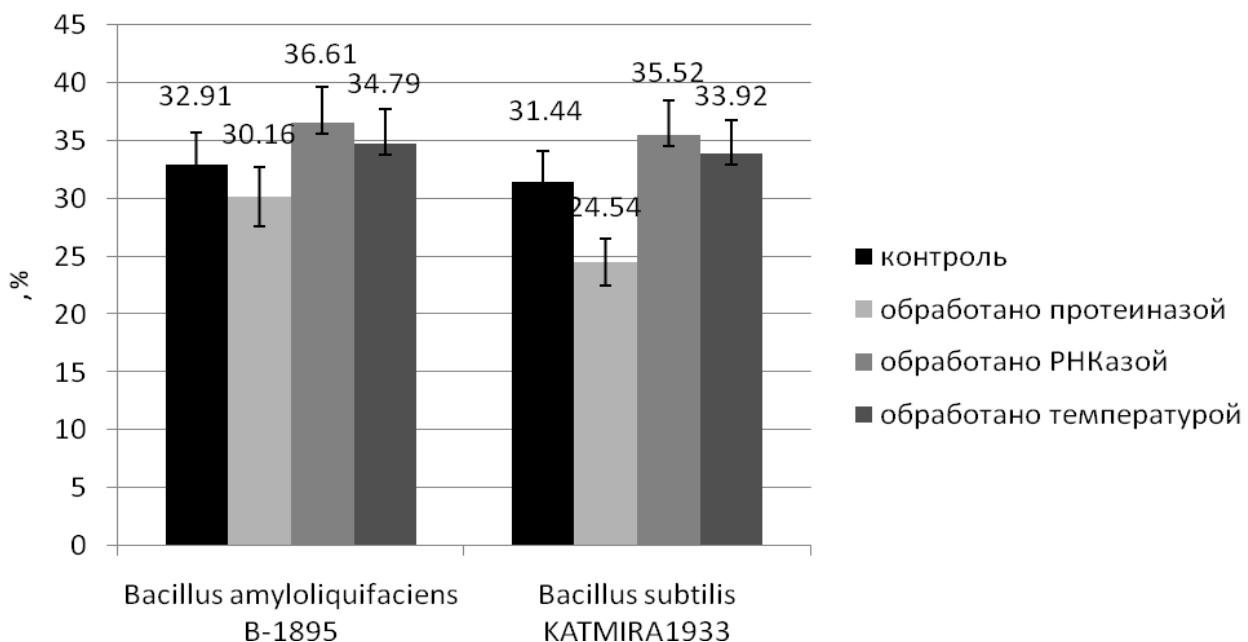


Рисунок 3. Влияние температуры, протеиназы и РНКазы на SOS-ингибирующую активность ферментатов двух штаммов бацилл

Как видно из представленных данных, активное вещество культуральной жидкости, проявляющее SOS-ингибирующую активность, не реагирует на изменения температуры. Кроме того, его активность под действием как протеиназы, так и РНКазы, не уменьшается.

Антимутагенный эффект *in vivo*.

Была проведена оценка способности ферментатов пробиотических бактерий подавлять развитие антибиотикорезистентности у клинических изолятов грамотрицательных и грамположительных патогенных бактерий. Параметры спонтанной и индуцированной частоты мутаций антибиотикорезистентности при действии ферментатов пробиотических микроорганизмов на клинические изоляты *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* представлены в таблицах 4 и 5 соответственно.

Таблица 4. Параметры спонтанной и индуцированной частоты мутаций антибиотикорезистентности при действии ферментатов пробиотических микроорганизмов на клинические изоляты *Escherichia coli*

	Рост бактерий на среде без рифампицина		Рост бактерий на среде с рифампицином	
	КОЕ/мл	Выживаемость, %	КОЕ/мл	Частота мутагенеза
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , 1%				
Контроль	$31,3 \pm 4,4 \cdot 10^6$	100,00	$3,8 \pm 0,12$	$1,21 \cdot 10^{-5}$
Протектор	$32,9 \pm 6,2 \cdot 10^6$	105,11	$3,6 \pm 1,02$	$1,09 \cdot 10^{-5}$
Индуктор	$8,3 \pm 1,3 \cdot 10^6$	26,52*	$2,4 \pm 0,49$	$2,89 \cdot 10^{-5}*$
Индуктор+ протектор	$19,2 \pm 2,4 \cdot 10^6$	61,34*	$1,9 \pm 0,50$	$0,99 \cdot 10^{-5}$
<i>Lactobacillus paracasei</i> 2647, 1%				
Контроль	$32,0 \pm 3,8 \cdot 10^6$	100,00	$4,4 \pm 1,27$	$1,38 \cdot 10^{-5}$
Протектор	$33,6 \pm 2,6 \cdot 10^6$	105,00	$4,8 \pm 0,93$	$1,43 \cdot 10^{-5}$
Индуктор	$8,9 \pm 2,6 \cdot 10^6$	27,81*	$3,7 \pm 0,56$	$4,16 \cdot 10^{-5}*$
Индуктор+ протектор	$21,2 \pm 2,3 \cdot 10^6$	66,25*	$3,0 \pm 0,64$	$1,42 \cdot 10^{-5}$
<i>Enterococcus durans</i> B6367, 1%				
Контроль	$37,6 \pm 1,8 \cdot 10^6$	100,00	$3,9 \pm 0,97$	$1,04 \cdot 10^{-5}$
Протектор	$35,6 \pm 1,4 \cdot 10^6$	94,68	$4,7 \pm 0,87$	$1,32 \cdot 10^{-5}$
Индуктор	$10,6 \pm 1,7 \cdot 10^6$	28,19*	$4,1 \pm 1,08$	$3,87 \cdot 10^{-5}*$

Продолжение таблицы 4

	Рост бактерий на среде без рифампицина		Рост бактерий на среде с рифампицином	
	KOE/мл	Выживаемость, %		KOE/мл
Индуктор+ протектор	$30,4 \pm 6,7 \cdot 10^6$	80,85*	$2,4 \pm 0,64$	$0,79 \cdot 10^{-5}$ *
<i>Enterococcus durans</i> B6379, 1%				
Контроль	$35,5 \pm 3,8 \cdot 10^6$	100,00	$3,4 \pm 1,15$	$0,96 \cdot 10^{-5}$
Протектор	$37,2 \pm 2,1 \cdot 10^6$	104,79	$4,2 \pm 0,48$	$1,13 \cdot 10^{-5}$
Индуктор	$9,0 \pm 1,6 \cdot 10^6$	25,35*	$3,2 \pm 0,34$	$3,56 \cdot 10^{-5}$ *
Индуктор+ протектор	$25,8 \pm 1,7 \cdot 10^6$	72,68*	$2,5 \pm 0,82$	$0,97 \cdot 10^{-5}$
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B1895				
Контроль	$130 \pm 15 \cdot 10^{-6}$	100%	390 ± 6	$3,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$
Протектор	$152 \pm 11 \cdot 10^{-6}$	117%	470 ± 9	$3,1 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$
Индуктор	$220 \pm 6 \cdot 10^{-5}$	18%*	220 ± 7	$10 \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$ *
Индуктор+ протектор	$228 \pm 12 \cdot 10^{-5}$	17%*	100 ± 2	$4,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$ *
<i>Bacillus subtilis</i> Katmira 1933				
Контроль	$130 \pm 15 \cdot 10^{-6}$	100%	390 ± 6	$3,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$
Протектор	$159 \pm 13 \cdot 10^{-6}$	117%	410 ± 9	$3,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$
Индуктор	$220 \pm 6 \cdot 10^{-5}$	18%*	220 ± 7	$10 \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$ *
Индуктор+ протектор	$235 \pm 12 \cdot 10^{-5}$	17%*	100 ± 2	$4,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$ *

* Отличие от контроля статистически достоверно, $p < 0,05$

Частота спонтанного мутагенеза различалась в серии повторов и составила $0,96\text{--}1,21 \cdot 10^{-5}$ для *E. coli* и $2,63\text{--}3,75 \cdot 10^{-5}$ для *S. aureus*, в зависимости от номера эксперимента.

Таблица 5. Параметры спонтанной и индуцированной частоты мутаций антибиотикорезистентности при действии ферментатов пробиотических микроорганизмов на клинические изоляты *Staphylococcus aureus*

	Рост бактерий на среде без рифампицина		Рост бактерий на среде с рифампицином	
	KOE/мл	Выживаемость, %	KOE/мл	Частота мутагенеза
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , 1%			
Контроль	$15,2 \pm 1,5 \cdot 10^6$	100,00	$4,0 \pm 1,3$	$2,63 \cdot 10^{-5}$
Внесение протектора	$13,2 \pm 1,7 \cdot 10^6$	86,84	$3,8 \pm 0,2$	$2,88 \cdot 10^{-5}$
Внесение индуктора	$6,7 \pm 0,4 \cdot 10^6$	44,08*	$2,9 \pm 1,0$	$4,33 \cdot 10^{-5}*$
Внесение индуктора и протектора	$12,3 \pm 1,1 \cdot 10^6$	80,92*	$3,7 \pm 1,3$	$3,01 \cdot 10^{-5}*$
	<i>Lactobacillus paracasei</i> 2647, 1%			
Контроль	$14,4 \pm 1,0 \cdot 10^6$	100,00	$5,2 \pm 1,4$	$3,61 \cdot 10^{-5}$
Внесение протектора	$14,0 \pm 1,9 \cdot 10^6$	97,22	$4,9 \pm 1,2$	$3,50 \cdot 10^{-5}$
Внесение индуктора	$6,9 \pm 1,3 \cdot 10^6$	47,92*	$3,1 \pm 0,9$	$4,49 \cdot 10^{-5}*$
Внесение индуктора и протектора	$10,1 \pm 0,6 \cdot 10^6$	70,14*	$3,4 \pm 0,8$	$3,37 \cdot 10^{-5}*$
	<i>Enterococcus durans</i> B6367, 1%			
Контроль	$12,3 \pm 1,8 \cdot 10^6$	100,00	$4,4 \pm 0,9$	$3,58 \cdot 10^{-5}$
Внесение протектора	$11,8 \pm 2,4 \cdot 10^6$	95,93	$4,7 \pm 1,2$	$3,98 \cdot 10^{-5}$
Внесение индуктора	$6,0 \pm 1,7 \cdot 10^6$	48,78*	$3,4 \pm 1,0$	$5,67 \cdot 10^{-5}*$
Внесение индуктора и протектора	$9,1 \pm 1,1 \cdot 10^6$	73,98*	$3,9 \pm 0,6$	$4,29 \cdot 10^{-5}*$
	<i>Enterococcus durans</i> B6379, 1%			
Контроль	$13,6 \pm 2,9 \cdot 10^6$	100,00	$5,1 \pm 0,3$	$3,75 \cdot 10^{-5}$
Внесение протектора	$13,4 \pm 1,3 \cdot 10^6$	98,53	$4,6 \pm 1,4$	$3,43 \cdot 10^{-5}$
Внесение индуктора	$7,0 \pm 2,2 \cdot 10^6$	51,47*	$3,8 \pm 0,9$	$5,43 \cdot 10^{-5}*$
Внесение индуктора и протектора	$10,3 \pm 1,5 \cdot 10^6$	75,74*	$4,1 \pm 0,3$	$3,98 \cdot 10^{-5}*$

* Отличия от контроля статистически достоверны, $p < 0,05$

Ципрофлоксацин увеличивал число мутантов, устойчивых к рифампицину, и частота индуцированного мутагенеза в серии опытов увеличивалась в 2,4-3,7 раз для *E. coli* и в 1,3-1,7 раз для *S. aureus* по сравнению со спонтанным мутагенезом. При этом выживаемость бактерий в серии повторов составила 25-28% для *E. coli* и 44-51% для *S. aureus*, в зависимости от номера эксперимента.

Было показано, что ферментаты *L. rhamnosus*, *L. paracasei* 2647, *E. durans* 6367, *E. durans* 6379 снижали частоту индуцированного мутагенеза *E. coli* и *S. aureus*.

Для *E. coli* ферментат *L. rhamnosus* снижал частоту индуцированного мутагенеза на 66%, *L. paracasei* 2647 на 65%, *E. durans* 6367 на 80%, *E. durans* 6379 на 72%. Следует отметить, что ни один из указанных экстрактов не оказывал 100% снижения индуцированного мутагенеза до уровня спонтанного.

Для *S. aureus* ферментат *L. rhamnosus* снижал частоту индуцированного мутагенеза на 30%, *L. paracasei* 2647 на 25%, *E. durans* 6367 на 24%, *E. durans* 6379 на 27%. Следует отметить, что ни один из указанных экстрактов не оказывал 100% снижения индуцированного мутагенеза до уровня спонтанного.

Ферментат пробиотических штаммов *Bacillus* также снижал частоту индуцированного мутагенеза у *E. coli*: она была почти вдвое ниже частоты появления резистентных мутантов в пробах без добавления супернатанта – на 56 и 57% по сравнению с контролем для *B. amyloliquefaciens* B-1895 и *B. subtilis* Katmira 1933, соответственно ($p < 0,05$).

Выделение фракций метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus* и *Lactobacillus* и изучение их активности

Из культуральной жидкости штамма *Lactobacillus rhamnosus* было получено 23 фракции, из них выбрали 6, соответствовавших пикам на хроматограмме:

- Первый пик с выходом на 30-50мин представлен несорбировавшимися компонентами, белками и пептидами с изоэлектрической точкой выше pH 8,7;
 - второй пик, 60-80мин, представлен слабо удерживаемыми компонентами, элюировавшимися при минимальном возрастании ионной силы;
 - третий и четвертый пики, 80-130 мин, представлены белками, имеющими выраженный отрицательный заряд при pH 8.7;
 - пятый пик, элюировавшийся при проводимости 26mS/sm;
 - шестой пик элюировался при увеличении концентрации соли до 1M и представлен веществами, имеющими несколько отрицательно заряженных групп при данном pH.

Анализ в серии биосенсорных тестов показал следующее. Фракция номер 1 демонстрировала ДНК-протекторную активность, снижая повреждение ДНК диоксидином на 43,23 %; SOS-ингибирующую активность, снижая SOS-ответ, индуцированный ципрофлоксацином, на 29,92%; антиоксидантную активность,

снижая уровень окислительных повреждений, вызванных перекисью водорода, на 77,30 %. Фракция номер 2 демонстрировала более низкую ДНК-протекторную (31,59 %), SOS-ингибирующую (19,10 %) и антиоксидантную (75,47 %) активности. В фракции номер 3 не наблюдалось ДНК-протекторной активности, тогда как SOS-ингибирующая (72,66 %) и антиоксидантная (70,78 %) значительно возросли. Фракция номер 4 демонстрировала низкую ДНК-протекторную (4,76 %), SOS-ингибирующую (46,75 %) активности. Антиоксидантная активность здесь была максимальной (93,66 %). Фракции номер 5 и 6 не проявляли ДНК-протекторной активности. SOS-ингибирующая и антиоксидантная активности были значительно ниже для фракции 5 (32,16 % и 45,30 % соответственно). Для фракции 6 SOS-ингибирующая активность была крайне незначительна (3,28%), тогда как антиоксидантная активность составила 46,81 %.

Обобщенные данные представлены на рис. 4. Все отличия от контроля статистически значимы при $p < 0,05$.

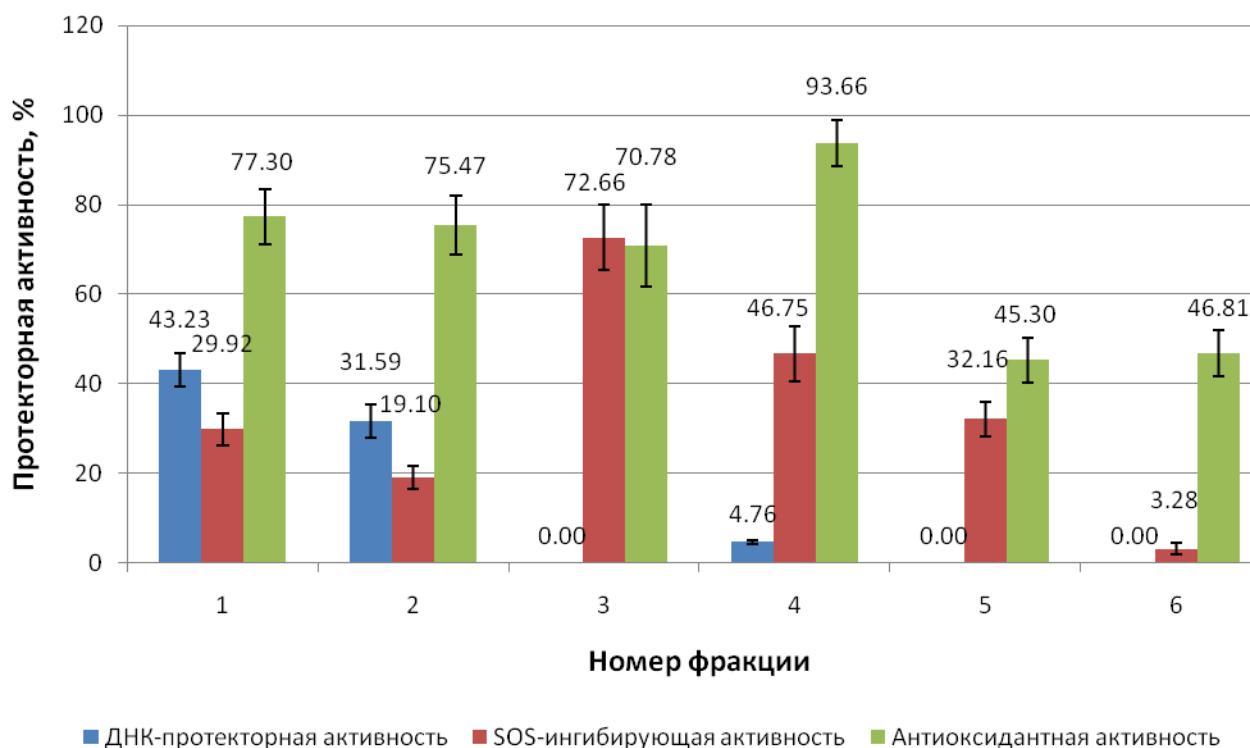


Рисунок 4. Биологическая активность фракций метаболитов *Lactobacillus rhamnosus*.

Таким образом, можно заключить, что метаболиты, обладающие ДНК-протекторной активностью, содержатся в фракциях 1-2, SOS-ингибирующей – преимущественно в фракции 3. Соединений с антиоксидантной активностью больше всего в фракции 4, хотя остальные фракции также проявляют менее выраженный антиоксидантный эффект.

Антиоксидантный эффект метаболитов бактерий может быть обеспечен как специфическими белками, так и неспецифическими низкомолекулярными соединениями – фенольные соединения, органические кислоты и др.

(Меньщикова, 2006). Фракция 4, судя по всему, содержит выделенные из клеток антиоксидантные ферменты.

При изучении фракций метаболитов штаммов *Bacillus* было произведено предварительное разделение фракций культуральной жидкости с помощью фильтров Amicon Ultra на 3,10, 30 и 100 кДа. Было установлено, что ДНК-протекторная активность штамма *B. amyloliquifaciens* B-1895 сохраняется в фракции размером <3 кДа и даже незначительно увеличивается после пропускания через фильтр, по-видимому, за счет повышения концентрации действующего вещества в растворе и удаления возможных ингибиторов (активность нефильтрованной культуральной жидкости составила $50,95 \pm 2,1\%$, активность выделенной фракции - $61,02 \pm 5,3\%$). Активность штамма *B. subtilis* Katmira 1933 сохраняется в фракции с размером молекул 3-10 кДа ($55,58 \pm 4,2\%$ в нефильтрованном препарате и $60,11 \pm 6,1\%$ в выделенной фракции), тогда как в фракции с размером молекул <3 кДа активность снижается ($33,0 \pm 0,8\%$).

Фракции, полученные из культуральной жидкости *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895, в биосенсорном тесте вызывали следующие эффекты:

фракции № 2 и 4 - бактерицидный эффект (гибель клеток биосенсоров);

фракция № 3 – индукция неспецифического SOS-ответа;

фракции № 1 и 5 – протекторный эффект (Рис. 5)

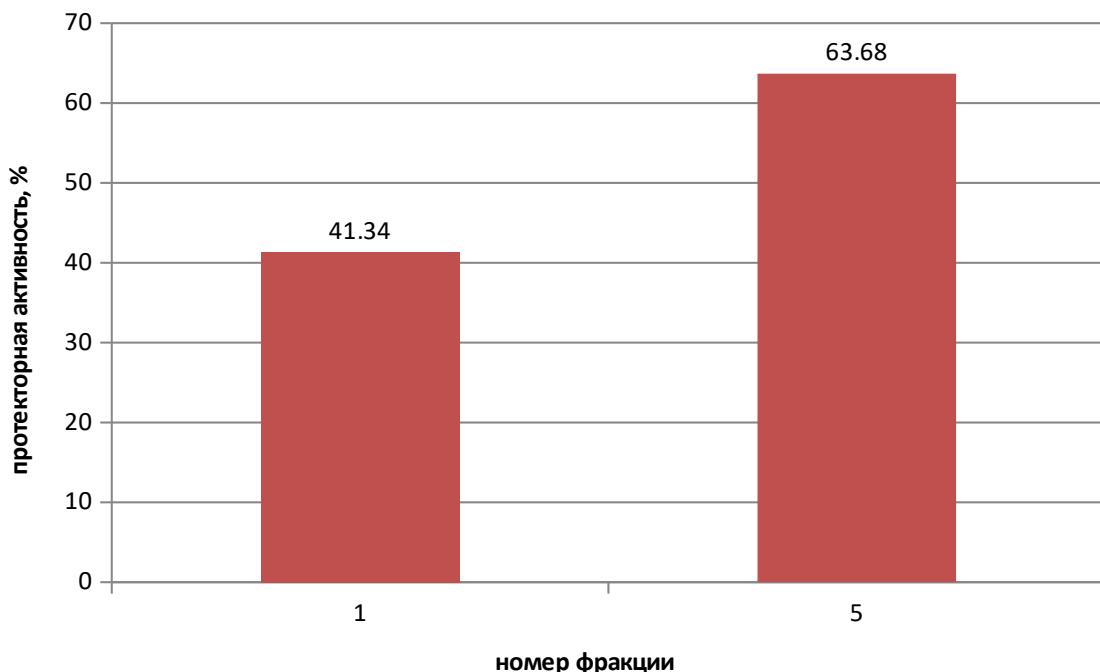


Рисунок 5. Протекторная активность фракций метаболитов *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895

Фракции, полученные из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* КАТМИРА 1933:

Фракции № 2,4-7 – эффект отсутствует;

Фракции № 1, 3, 9, 10 – индукция неспецифического SOS-ответа;

Фракции 8,11,13 – протекторный эффект (рис. 6).

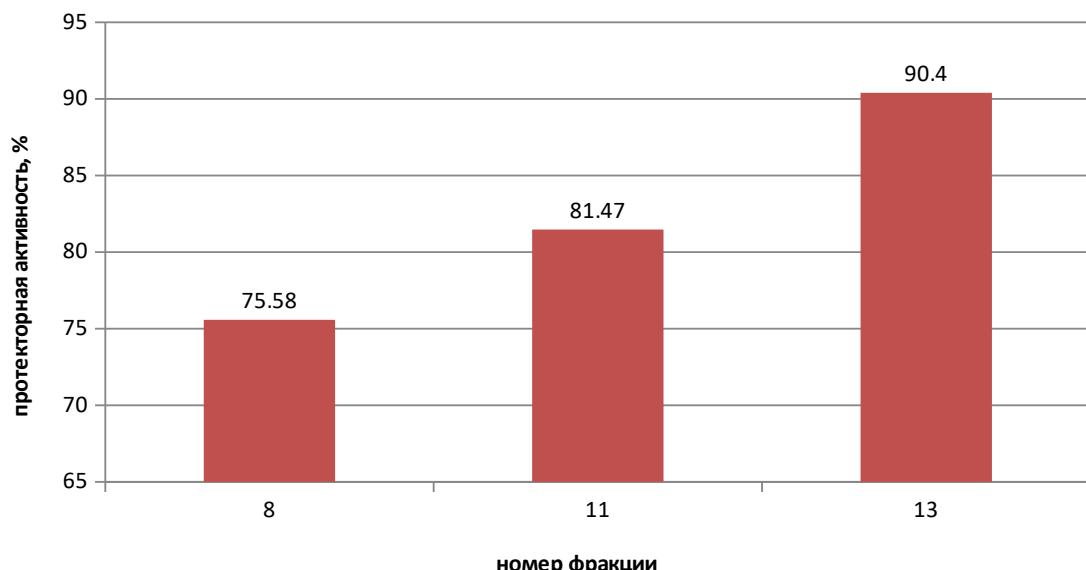


Рисунок 6. Протекторная активность фракций метаболитов *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933.

Для масс-спектрометрического анализа были отобраны два образца, представляющие собой фракции с наиболее высокой SOS-ингибирующей активностью. При спектрофотометрическом анализе образцы демонстрировали пик поглощения на 200-220 нм, что говорит о присутствии в них соединений с пептидными связями. В качестве контроля была использована стерильная культуральная среда, подвергнутая тем же манипуляциям, что и образцы.

В целом масс-спектры опытных образцов представлены в основном однозарядными ионами с m/z не более 1000 почти для всех хроматографических пиков.

Хроматограмма образца 1, представленная на рисунке 7, значительно отличается от таковой для контрольного образца. Общее количество tandemных MS/MS-спектров, для ионов с зарядным состоянием более 2+ для данного образца составляет 2319 спектров. На масс-спектрах присутствует большее количество многозарядных ионов, предполагая наличие пептидов массой более 1500 Да, причем такая картина наблюдается практически для всех хроматографических пиков. Например, на рисунке 8 одним из основных пиков, представленных на спектре, является пик с m/z 755.32 и с зарядовым состоянием, определенным как 3+, что соответствует пептиду массой 2265,96 Да.

Основными пиками, представленными на спектре, является пик с m/z 545.81 с зарядовым состоянием, определенным как 3+, пик с m/z 755.32 с зарядовым состоянием, определенным как 3+, а также присутствует пик с m/z 1103.44 с зарядовым состоянием, определенным как 2+.

Для одного из основных пиков хроматограммы образца 2, с m/z 391.22 с зарядовым состоянием, определенным как 2+, был получен tandemный спектр соударительной фрагментации пептида, который удалось расшифровать как последовательность D(L\I)GPAGPR (рис.9), или Asp- Leu/Ile-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg.

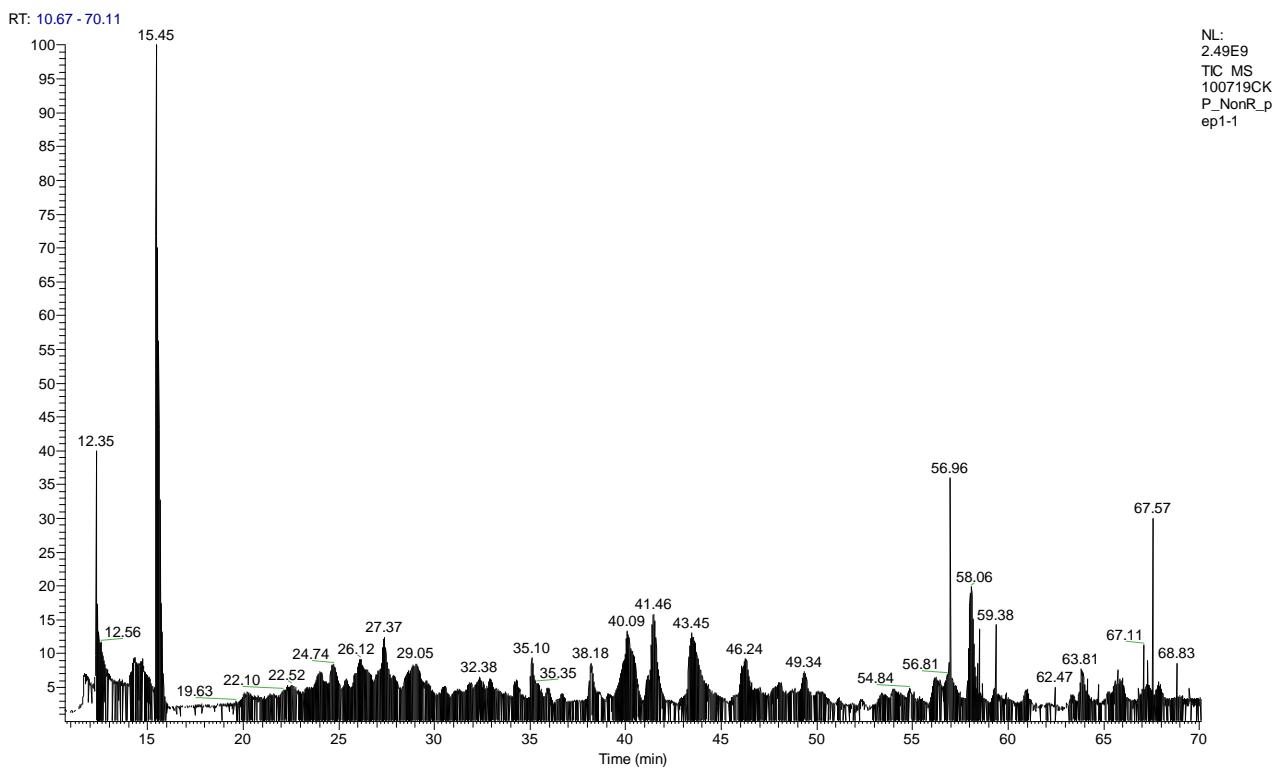


Рисунок 7. Хроматограмма образца 1, соответствующая градиенту от 11 до 70 мин.

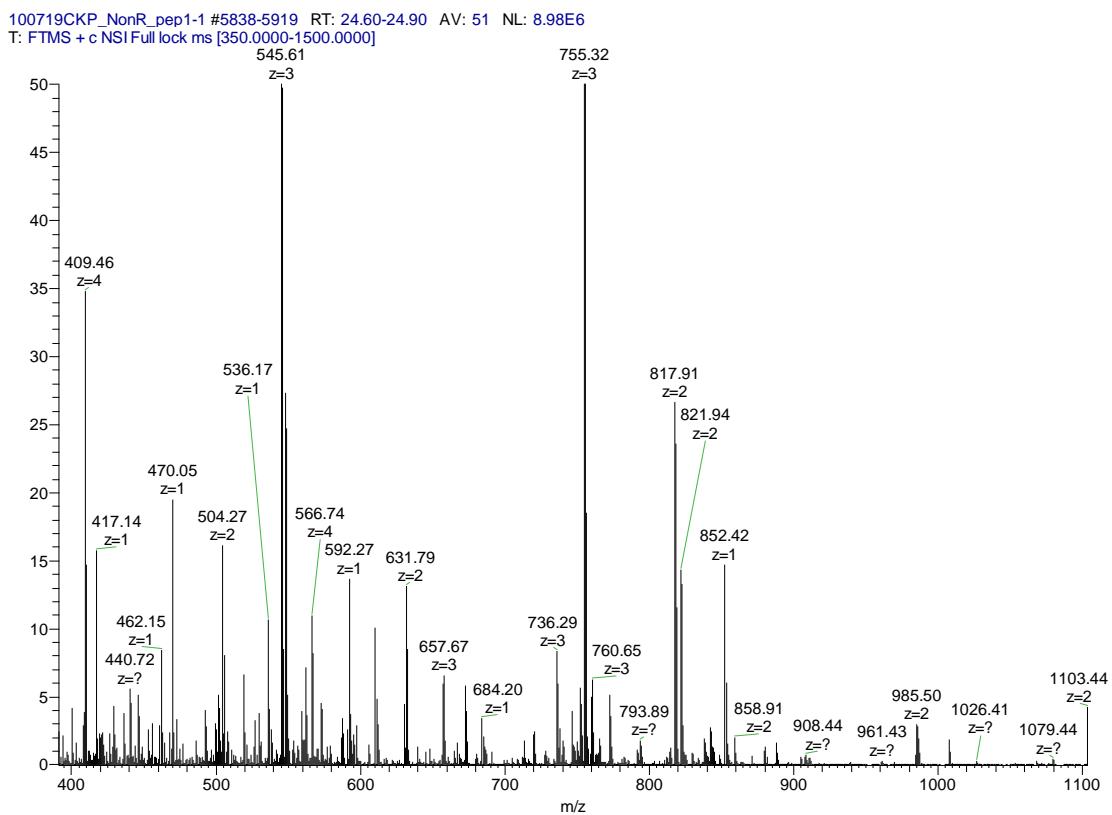


Рисунок 8. Масс-спектр образца 1, соответствующий элюенту с временем удержания 24,6-24,9 мин.

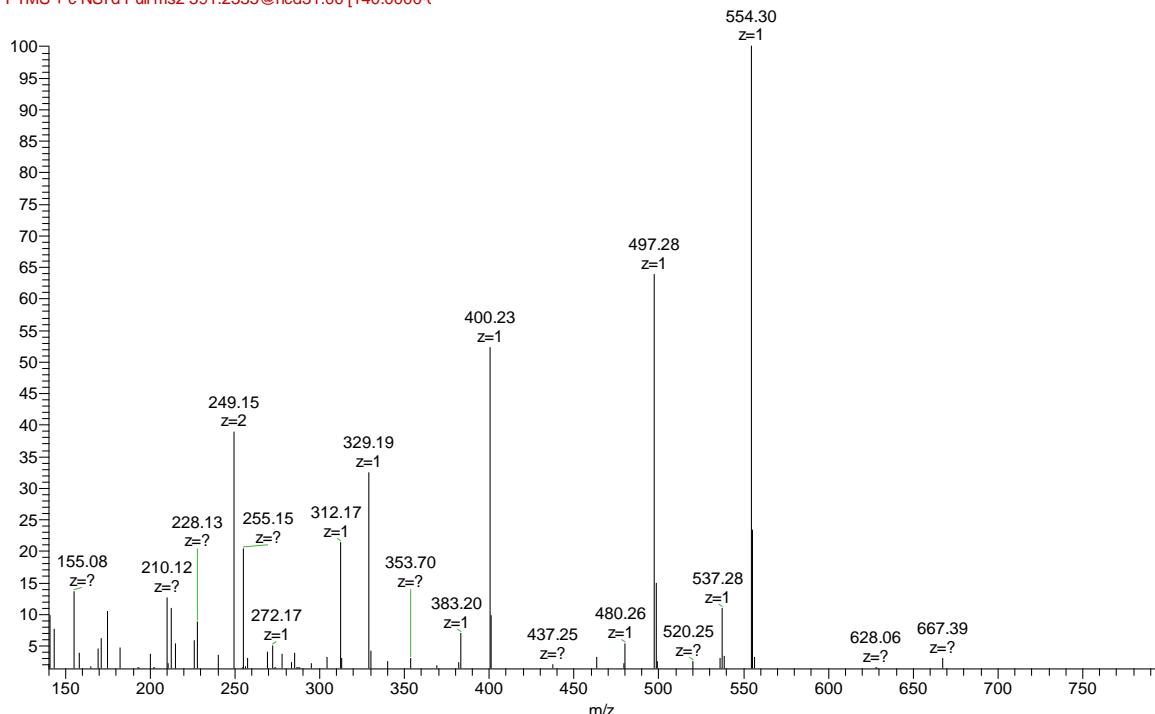


Рисунок 9. Спектр соударительной фрагментации (MS/MS) родительского иона m/z 391.22²⁺

В целом данные масс-спектрометрического анализа позволяют заключить, что действующие вещества в выделенных фракциях имеют пептидную природу и размеры не более 3 кДа. О пептидной природе образцов можно судить по наличию ионов с зарядным состоянием более 2+ по характерным для пептидов спектрам соударительной фрагментации (MS/MS-спектрам).

Размер пептидов, обнаруженных в фракциях 1-3, представлен в таблице 4.

Таблица 4. Размер метаболитов в фракциях *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 с SOS-ингибирующей активностью.

Номер фракции	размер (Да)
0 (контроль)	603,00; 816,00; 1238,66
1	1418,70; 1637,43; 2265,96; 2206,88; 1747,83; 2249,97; 1641,96; 1640,94; 1977,99; 1962,00; 1960,98
2	641,33; 782,44; 1133,62; 1147,64

Среда, не ферментированная бактериями, также содержит олигопептиды, однако спектр их отличается от такового, по крайней мере, для пробы 1.

Изучение пробиотической активности штаммов *Bacillus* на курах

Для реализации проекта в 2016 году были сформированы 8 групп суточных цыплят родительского стада кросса «Хайсекс браун» (4 группы курочек по 70 голов и 4 группы петушков по 7 голов в каждой). Группы формировались следующим образом: контрольная, I, II и III – опытные. Контрольная группа получала стандартный рацион, в рацион опытных вводятся

препараты пробиотических штаммов (I группа - на основе штамма *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933, II группа - на основе штамма *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 и III группа – на основе *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 в равных пропорциях). Штаммы были выбраны на основании данных предшествовавшего скрининга.

Физиологические и биохимические эффекты.

В течение первого года проекта в ходе наблюдений за птицами был выявлен эффект стимуляции роста. Мониторинг физиологических параметров опытных и контрольной групп птиц в течение второго года показал, что к началу яйцекладки набор живой массы во всех опытных группах был выше, чем в контрольной, но находился в пределах нормативных показателей для данного кросса птицы, так же как и развитие репродуктивных органов ремонтного молодняка. Масса яичника и длина яйцевода ремонтных молодок опытных групп достоверно превышала контроль. Эти тенденции сохранились и получили развитие в течение третьего этапа работ. Так, разница в живой массе сохранялась в течение всей жизни птиц вплоть до 81 недели (в I группе - 4,31%, во II группе - 3,86% и III группе - на 0,83%).

Содержание гемоглобина, эритроцитов в крови, уровня общего белка и альбуминов, содержание мочевины в сыворотке крови птиц, получавших изучаемые добавки, достоверно увеличилось по отношению к контролю на протяжении всего изучаемого периода. Содержание витамина А, витамина Е, витамина В1, витамина В2 в печени птиц опытных групп значительно превышало контроль. К концу эксперимента наблюдалось значительное увеличение содержания общего белка в сыворотке крови у цыплят экспериментальной группы по сравнению с контролем: на 12,68% ($P < 0,01$) в группе I, 9,16% ($P < 0,01$) в группе II и 6,20. % ($P < 0,05$) в группе III. Аналогичная тенденция наблюдалась у петухов с увеличением на 9,95% ($P < 0,01$), 6,57% ($P < 0,05$) и 5,62% ($P < 0,05$) соответственно. Было также обнаружено увеличение уровня глюкозы, не превышающее стандартных показателей.

Самцы опытных групп превосходили контрольную группу по концентрации спермиев, общему числу спермиев и суммарному содержанию аминокислот в эякуляте, количество морфологически аномальных клеток было достоверно ниже.

Продуктивность кур на всем протяжении учетного периода была высокой и соответствовала ее стандарту породы, однако в опытных группах яйценоскость кур-несушек превышала контроль.

Морфологический анализ инкубационных яиц, проведенный перед инкубацией, выявил более высокие значения следующих показателей в опытных группах относительно контроля: масса яиц; масса желтка; толщина скорлупы яиц; индекс белка; число единиц ХАУ. Содержание каротиноидов, витамина А, витамина Е, витамина В1 в желтке яиц, витамина В2 в белке яиц, полученных от кур опытных групп, превышало контроль. Кроме того, в яйцах кур экспериментальных групп наблюдалось увеличение количества кальция и

фосфора. Содержание кальция в яйцах первой опытной группы было выше контрольной на 40,94 ($p < 0,05$), второй опытной - на 27,0 и третьей - на 21,34%.

На завершающем этапе работ для всех групп наблюдалось естественное снижение яйценоскости, связанное с возрастом, но в экспериментальных группах I и II оно происходило медленнее. На 82-й неделе яйценоскость в группах I и II по-прежнему превышала контроль. Наиболее значимый результат наблюдался в I группе (на 4%). Проведенный нами регрессионный анализ динамики изменения относительной яйценоскости позволяет заключить, что темп старения кур в I опытной группе по сравнению с контрольной замедлился на 2,1%.

Антимутагенные эффекты

В течение 1 года работ было отмечено статистически значимое снижение уровня повреждения мтДНК во II группе. В течение второго этапа было выявлено снижение относительного числа повреждений в митохондриальной ДНК I группы по сравнению с контрольной группой на 20-22 %.

На третьем этапе статистически значимое уменьшение числа повреждений митохондриальной ДНК было обнаружено в группе I по сравнению с контрольной группой. Относительный уровень повреждения мтДНК у цыплят составил: $2,26 \pm 0,56$ в контрольной группе, $1,69 \pm 0,45$ в группе I, $2,17 \pm 0,46$ в группе II, $2,23 \pm 0,6$ в группе III. По сравнению с контрольной группой выявлено статистически значимое снижение количества повреждений в I группе на 34% ($p = 0,009$) (рис.10).

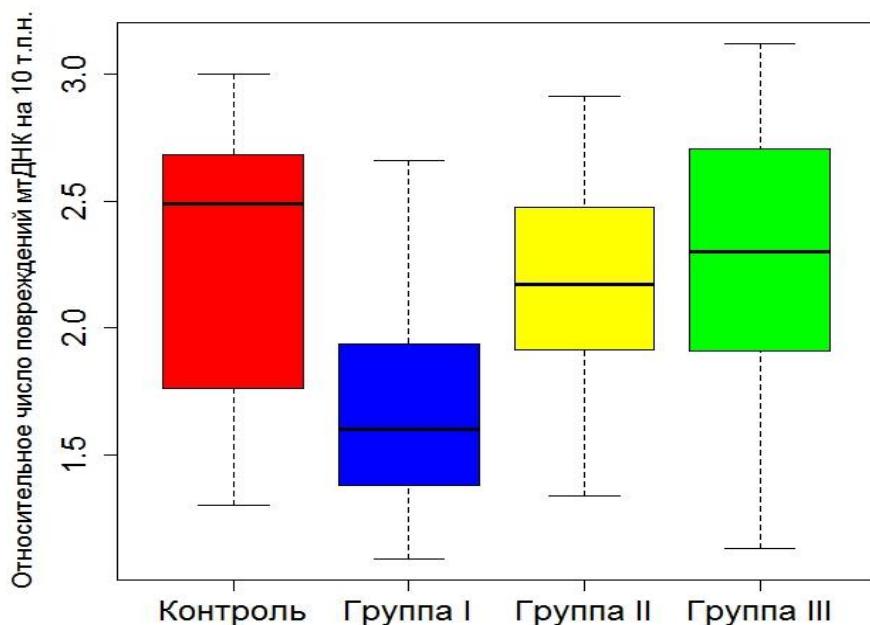


Рисунок 10. Относительное число повреждений в митохондриальной ДНК у контрольной и трех опытных групп кур.

В отличие от мтДНК, статистически значимых различий стабильности яДНК между контрольной и экспериментальными группами кур не установлено. Статистически значимых различий в относительной длине

теломер между контрольной и экспериментальными группами за весь период эксперимента также установлено не было.

Влияние на экспрессию генов

На третьем этапе работ было установлено, что пробиотическая добавка *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 (группа I) увеличивает транскрипционную активность генов синтеза вителлогенина (*vtg1*, *vtg2*, *vtg3*), а комбинированный препарат (группа III) вызывает повышение экспрессии генов *vtg1* и *vtg3*. Вителлогенин является белком-предшественником яичного желтка, и гены, контролирующие его синтез, активно экспрессируются в печени цыплят в течение их репродуктивного периода.

Кроме того, известно, что вителлогенин действует как антиоксидант, способствующий долголетию пчелиных маток - у них экспрессия гена вителлогенина выше по сравнению с рабочими особями, и они более устойчивы к окислительному стрессу (Corona et al, 2007). Он обладает мембранотропной активностью, связываясь с липосомами, содержащими фосфатидилсерин, - липид внутренней мембранных клеточных мембран, что и обеспечивает его антиоксидантные и противовоспалительные свойства (Havukainen, 2013).

Результат анализа уровней экспрессии гена *vtg1* у кур представлен на рисунке 11. Этот показатель составил: 52.9 ± 10.1 в контрольной группе, 69.8 ± 17.8 в I группе, 58.5 ± 14.6 во II группе, 63.5 ± 12.8 в III группе. Достоверное повышение уровня мРНК *vtg1* отмечено для I группы на 31 % ($P=0.005$) и III группы на 20 % ($P=0.038$).

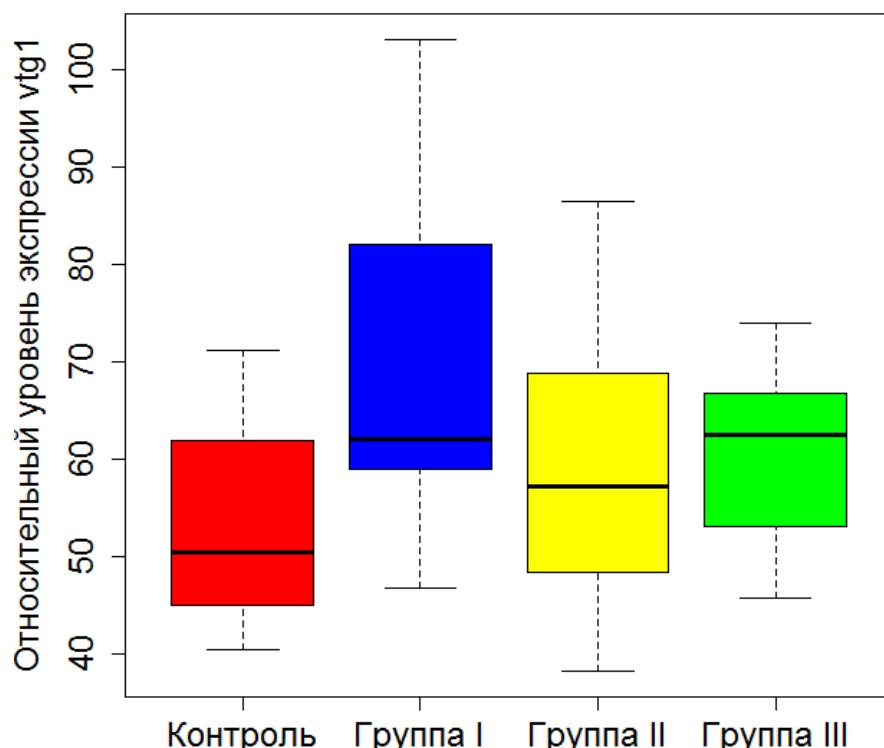


Рисунок 11. Относительный уровень экспрессии гена *vtg1* у контрольной и трех опытных групп кур.

Результат анализа уровня экспрессии гена *vtg2* у кур представлен на рисунке 12. Этот показатель составил: 73.5 ± 8.5 в контрольной группе, 99.5 ± 29.4

в I группе, 85.5 ± 15.3 во II группе, 82.5 ± 13.5 в III группе. Достоверное увеличение транскрипционной активности гена *vtg2* было выявлено только у кур I группы на 35 % ($P=0.003$).

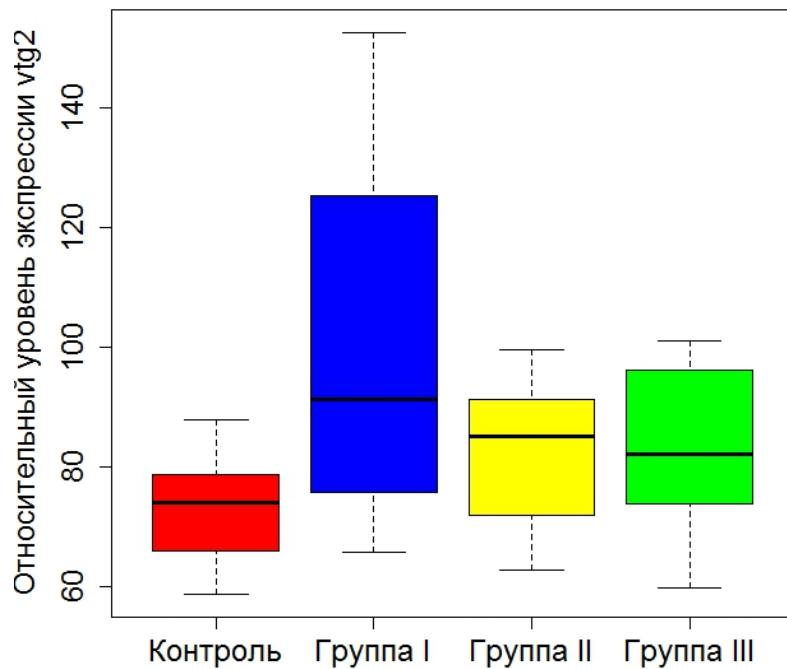


Рисунок 12. Относительный уровень экспрессии гена *vtg2* у контрольной и трех опытных групп кур.

Результат анализа уровень экспрессии гена *vtg3* у кур представлен на рисунке 13. Этот показатель составил: 0.011 ± 0.002 в контрольной группе, 0.020 ± 0.006 в I группе, 0.015 ± 0.007 во II группе, 0.017 ± 0.007 в III группе. По сравнению с контролем уровень мРНК *vtg3* был достоверно выше у кур I группы на 82 % ($P=0.0003$) и у кур III группы на 58 % ($P=0.0029$).

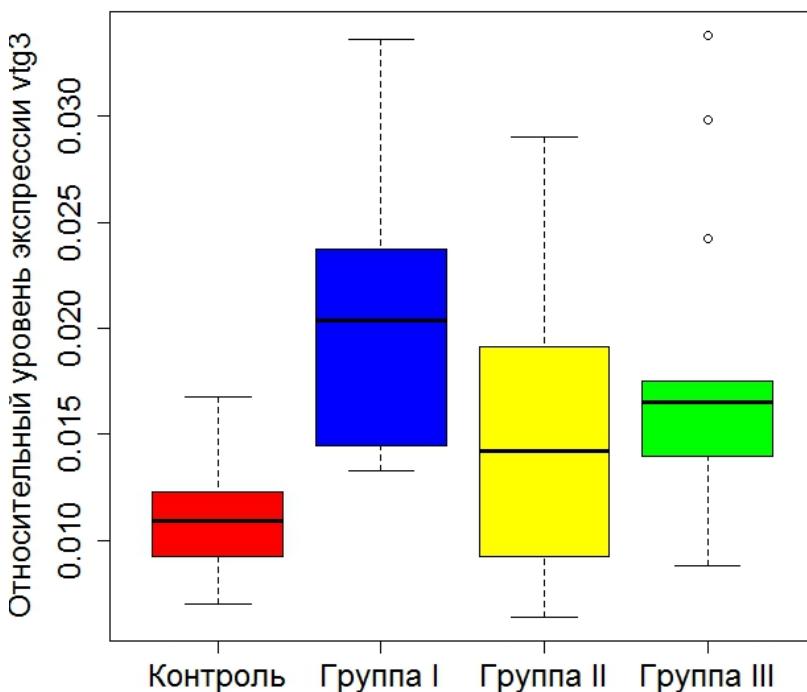


Рисунок 13. Относительный уровень экспрессии гена *vtg3* у контрольной и трех опытных групп кур.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что пробиотическая добавка *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 (I группа) снижала уровень повреждений митохондриальной ДНК и повышала транскрипционную активность генов синтеза вителлогенина (*vtg1*, *vtg2*, *vtg3*), а комбинированный пробиотический препарат (III группа) вызвал лишь увеличение экспрессии генов *vtg1* и *vtg3*. Важно отметить, что активность генов синтеза вителлогенина может быть информативным показателем репродуктивного старения у кур.

Биоинформационный анализ генома пробиотических штаммов *Bacillus*.

Хотя данные штаммы не известны как продуценты нерибосомальных пептидов, анализ генома *B. subtilis* KATMIRA1933 с помощью программы NP Searcher показывает наличие в нем трех модульных нерибосомальных пептид-синтаз (НРПС) и одной смешанной полипептид-поликетид-синтазы, продуктом которых должны являться следующие олигопептиды (в скобках указаны расчетные массы):

- glu leu leu val asp leu leu (813.99)
- mal* mal mal gly
- nrp* gly thr
- glu orn tyr thr glu val pro glu tyr ile phe (1421.56)

*mal – не уточненный малонилированный поликетид, nrp – не уточненная аминокислота (Milano et al, 2013).

Первая молекула с расчетной массой 814 имеет сходство с группой сурфактин-подобных пептидов (PubChem CID: 91974341). Будучи модифицированной жирными кислотами разной длины, она является основой для спектра продуктов с m/z 1,030, 1,044, 1,058, и 1,072, вырабатываемых штаммами *B. subtilis* (Yang H. et al, 2015). В работе (Korenblum et al, 2012) аналогичное соединение названо AMS H2O-1 и охарактеризовано как смесь изоформ 1007-1049 Да, обладающую антимикробной активностью.

В геноме *B. amyloliquifaciens* B-1895 тем же методом обнаруживается 4 модульные НРПС и две смешанные НРПС-ПКС со следующими продуктами:

- mal mal mal nrp gly
- glu leu leu val asp (587,67)
- val pro glu tyr ile nrp
- mal nrp asn tyr asn gln pro asn ser
- nrp gly thr
- orn tyr thr lys glu (671.75)

Вторая молекула представляет собой укороченную на 2 остатка лейцина версию вышеописанного сурфактин-подобного метаболита.

Механизмы действия пробиотиков (обсуждение).

Широкий спектр эффектов, оказываемых пробиотиками, позволяет говорить о них как обладающих системным действием. Но термин «системный» означает в том числе, что эффект не может быть объяснен простым суммированием множества мелких эффектов. В большинстве случаев действие пробиотиков описывают именно таким образом - как сумму антиоксидантного, антагонистического и др. эффектов. Системный же принцип предполагает воздействие на критические точки, регуляторы, причем данное воздействие, должно передаваться внутри клетки по принципу каскадного усиления сигнала, что объясняло бы эффекты весьма незначительных доз. В живых организмах действительно присутствуют системы, управляемые сравнительно простыми «переключателями» - регуляторные каскады, опероны генов и т.п. Через эти системы пробиотические бактерии могут взаимодействовать как с остальными членами микробного сообщества, так и с хозяевами. Согласно современной системе взглядов, межвидовой антагонизм бактерий основан не только на стратегиях тотального уничтожения антагониста, но и включает в себя более тонкие механизмы, выработанные за миллионы лет межвидового соперничества, включая механизмы регуляции его метаболизма (Garcia-Bayona et al, 2018).

В качестве процессов-мишеней для вышеописанных эффектов в прокариотической клетке можно рассмотреть следующие:

1) SOS-репарация и экспрессия генов ответа на стрессовые реакции. SOS-ответ у бактерий является важнейшим механизмом мутагенеза (Williams, Schumacher, 2017). Как было показано в нашей работе, бесклеточный препарат пробиотических штаммов способен снижать SOS-ответ у *E.coli*, а также в несколько раз уменьшать число антибиотикорезистентных мутантов у грамположительных и грамотрицательных организмов.

2) «Чувство кворума». Данный механизм обеспечивает биопленкообразование, проявление патогенных свойств и устойчивость к факторам среды у множества бактерий. Кроме того, известно, что в биопленках скорость мутагенеза возрастает в 100 раз (Conibear et al, 2010). В качестве агентов, нарушающих «чувство кворума», рассматриваются, в частности, пептиды природного происхождения (Ribeiro, 2016).

В эукариотических клетках, согласно имеющимся данным, мишенями могут быть:

1) Процессы в митохондриях, в том числе генерация АФК и их инактивация, а также экспрессия митохондриальных генов. Появляются данные о том, что митохондрии, являющиеся, согласно общепринятым представлениям (Зоров и др., 2014) потомками симбиотических бактерий, выполняют в клетках роль регуляторного «командного центра» (Zolotukhin et al., 2016). Пробиотики же, как выясняется в последние годы, способны активно взаимодействовать с митохондриями хозяина (Saint-Georges-Chaumet, 2015).

2) Экспрессия ядерных генов-регуляторов, запускающих такие каскады, как, например, p38 МАР-киназный путь (Nakagawa et al, 2016; Savustyanenko, 2016). Чаще всего оказывается затронута экспрессия генов, ответственных за ответ на стрессовые воздействия, в частности, окислительный стресс. Активация данных каскадов способствует улучшению адаптации организма к стрессовым условиям и может приводить к увеличению продолжительности жизни (Nakagawa et al, 2016). Стоит отметить, что данные эффекты отмечались как при действии живых клеток, так и под влиянием бесклеточных препаратов (Savustyanenko, 2016).

В нашей работе, как было указано выше, наблюдались как влияние на геном митохондрий, так и на экспрессию ядерных генов синтеза вителлогенина – соединения, обладающего антиоксидантными свойствами.

Молекулы, которые могли бы обеспечить вышеописанные эффекты, должны обладать рядом свойств: 1) небольшие размеры (способность проникать сквозь мембранны); 2) устойчивость к протеиназам и другим факторам среды; 3) сродство к белковым рецепторам или сходство с белковыми факторами, участвующими в регуляторных каскадах; 4) существование в множестве изоформ и возможность быстрой перестройки структуры.

Свойства выделенных нами метаболитов позволяют заключить, что это пептиды небольшого размера. Для р. *Bacillus* характерны такие вторичные метаболиты, как нерибосомально синтезируемые пептиды (НРП). Они не превышают нескольких кДа в размерах, не денатурируют при воздействии температуры, не гидролизуются протеиназой К (Betzel et al, 1993). Такая устойчивость обеспечивается наличием в структуре нетипичных аминокислот и стереоизомеров (Zalila-Kolsi et al, 2016). Чаще всего НРП рассматриваются как антимикробные и противогрибковые агенты, однако в последнее время появляются данные об участии их в регуляторных процессах (Vasilchenko et al, 2019). НРП соответствуют всем вышеприведенным критериям. Следует отметить, что олигопептиды как регуляторные молекулы характерны для большинства живых организмов. Пептиды, вырабатываемые в том числе и человеческим организмом, имеют черты сходства с НРП (Savustyanenko, 2016), что позволяет предположить, что эти молекулы могут взаимодействовать с рецепторами со сходной конфигурацией.

Два охарактеризованных нами штамма *Bacillus*, как показывает анализ их генома, могут быть продуцентами НРП, в частности, сурфактин-подобных метаболитов. Сурфактин ранее рассматривался исключительно как противогрибковый агент, однако в последнее время появились данные о его противовоспалительной активности. В эукариотических клетках он способен действовать на LPS/TLR4 сигнальный путь, селективно ингибиравать цитозольные факторы воспаления, влиять на антигенпрезентирующую функцию макрофагов (Zhao, 2017).

Следовательно, пробиотические свойства бактерий родов *Bacillus* и *Lactobacillus* могут обеспечиваться, помимо общезвестных механизмов,

взаимодействиями с регуляторными процессами в геномах микроорганизмов-антагонистов (в частности, ингибированием SOS-ответа и снижением приспособляемости к антимикробным агентам), а также влиянием на экспрессию генов хозяина, в том числе регуляции интенсивности окислительного стресса, и уменьшению частоты мутагенеза. Одним из агентов подобных взаимодействий, по-видимому, являются олигопептиды нерибосомального происхождения.

Выводы

1. Из 9 изученных ферментатов пробиотических бактерий 8 демонстрируют способность ингибировать SOS-ответ у бактерий. Наиболее высокие значения были обнаружены у *E. durans* 6367 (58.71 %) и двух штаммов *Bacillus* (50,84% - 54,21%).
2. Ферментаты пробиотических дрожжей также демонстрируют SOS-ингибирующую активность, но в меньшей степени (в среднем 20,33-28,35%).
3. Было установлено, что ферментаты *L. rhamnosus*, *L. paracasei* 2647, *E.durans* 6367, *E. durans* 6379 снижают мутагенез, индуцированный ципрофлоксацином, у *E.coli* на 66, 65, 80, и 72% соответственно, у *S.aureus* на 30, 25, 24 и 27% соответственно. Ферментаты двух изученных штаммов *Bacillus* снижают уровень индуцированного мутагенеза у *E.coli* на 56 и 57%.
4. Вещества с целевой активностью в ферментатах бактерий рода *Bacillus* обладают термостабильностью и устойчивостью к действию протеиназ и РНКаз.
5. ДНК-протекторная активность штаммов сохраняется в фракции метаболитов <3 кДа для *B.amyloliquifaciens* B-1895 и <10 кДа для *B.subtilis* KATMIRA 1933.
6. Масс-спектрометрический анализ отдельных активных фракций позволяет заключить, что по крайней мере часть целевых метаболитов является олигопептидами.
7. В эксперименте на птицах было обнаружено превышение набора живой массы во всех опытных группах, принимавших препараты на основе штаммов *Bacillus*, по сравнению с контрольной. Наблюдались также различия в параметрах репродуктивных органов и улучшение биохимических показателей крови сохранялись. Кроме того, было отмечено замедление репродуктивного старения - в опытных группах I и II возрастное снижение яйценоскости происходило медленнее.
8. Статистически значимых различий в относительной длине теломер и в степени повреждения ядерной ДНК между контрольной и экспериментальными группами не установлено.
9. По сравнению с контрольной группой в I группе было выявлено статистически значимое снижение числа повреждений митохондриальной ДНК, тогда как статистически значимых различий стабильности яДНК не установлено.

10. Установлено, что пробиотическая добавка *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 (I группа) повышала транскрипционную активность генов синтеза вителлогенина (*vtg1*, *vtg2*, *vtg3*), а комбинированный пробиотический препарат (III группа) вызвал увеличение экспрессии генов *vtg1* и *vtg3*.
11. Системные эффекты пробиотических штаммов, по-видимому, реализуются через антиоксидантный и ДНК-протекторный эффекты их метаболитов, а также взаимодействие данных метаболитов с регуляторными каскадами как эукариотических хозяев, так и представителей микрофлоры – антагонистов пробиотиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, был показано, что пробиотические бактерии родов *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* выделяют метаболиты, обладающие антиоксидантной, antimутагенной, SOS-ингибирующей активностью, а также способны снижать уровень мутагенеза и интенсивность распространения генов антибиотикорезистентности в микрофлоре хозяев. Соединения, обеспечивающую эту активность, имеют пептидную природу, термостабильны, устойчивы к действию протеиназ и не превышают 3-10 кДа в размерах. Эксперимент на курах показал, что хроническое введение препарата, содержащего пробиотические бациллы, выделяющие комплекс природных антиоксидантов и ДНК-протекторов, не только стимулирует рост и яйценоскость продуктивной птицы, но и замедляет возрастное падение яйценоскости, а, следовательно, замедляет репродуктивное старение. Молекулярной основой такого замедления является стабилизация митохондриальной ДНК, а также влияние на экспрессию генов синтеза вителлогенина. Системность эффекта обеспечивается тем, что геном митохондрий играет роль ключевого элемента, действующего на множество регуляторных процессов. Свойства веществ, обеспечивающих целевую активность, позволяют предположить, что они относятся к нерибосомально синтезируемым вторичным метаболитам.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Praznova E. V. et al. Carotenoids-antioxidants of *D. radiodurans* stimulate regeneration in mice //Biology and Medicine. – 2014. – V. 6. – N. 3. – P. 1.
2. Praznova E. V. et al. DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 //Letters in Applied Microbiology. – 2015. – V. 61. – N. 6. – P. 549-554.
3. Золотухин, П. В., Беланова, А. А., Празнова, Е. В. и др. Митохондрии как сигнальный узел и мишень для отключения феноптоза (обзор) //Биохимия. – 2016. – Т. 81. – №. 4. – С. 465-475.

4. Мазанко М.С., Чистяков В.А., Празднова Е.В. и др. Диоксидин индуцирует антибиотикорезистентность бактерий //Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – Т. 34. – №. 4. – С.149-154
5. Празднова Е.В., Мазанко М.С., Золотухин П.В. и др. Роль остатка лизина в антиоксидантной и ДНК-протекторной активности олигопептидов// Успехи Геронтологии. – 2016. – Т.29. – № 5. – С.776-783
6. Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Pokudina I.O., Chmyhalo V.K., Korinfskaya S.A., Chistyakov V.A. Black tea as a potential inhibitor of mutagenesis in bacteria// Proceedings of the 7th Singapore Health & Biomedical Congress 2016/Annals Academy of Medicine. – 2016. – V. 45 (Suppl). – N. 9. – P.148
7. Galvan, Y.P., Alperovich, I., Zolotukhin, P., Prazdnova, E.V. et al. Fullerenes as anti-aging antioxidants //Current aging science. – 2017. – V. 10. – N. 1. – P. 56-67.
8. Zolotukhin P. V., Prazdnova E. V., Chistyakov V. A. Methods to assess the antioxidative properties of probiotics //Probiotics and antimicrobial proteins. – 2018. – V. 10. – N. 3. – P. 589-599.
9. Zolotukhin, P.V., Belanova, A.A., Beseda, D.K., Prazdnova, E.V., Chistyakov, V.A. Chemistry, biochemistry and signaling: The NFE2L2/AP-1 pathway// Periodico Tche Quimica. – 2018. – V. 15. (S. I. 1) – P. 103-111.
10. Chistyakov, V. A., Prazdnova, E. V. E., Mazanko, M. S., Bren, A. B. The use of biosensors to explore the potential of probiotic strains to reduce the SOS response and mutagenesis in bacteria //Biosensors. – 2018. – V. 8. – N. 1. – P. 25.
11. Chistyakov, V. A., Prazdnova, E. V., Mazanko, M. S., Churilov, M. N., & Chmyhalo, V. K. Increase in Bacterial Resistance to Antibiotics after Cancer Therapy with Platinum-Based Drugs //Molecular Biology. – 2018. – V. 52. – N. 2. – P. 232-236.
12. Mazanko, M. S., Gorlov, I. F., Prazdnova, E. V. et al. *Bacillus* probiotic supplementations improve laying performance, egg quality, hatching of laying hens, and sperm quality of roosters //Probiotics and antimicrobial proteins. – 2018. – V. 10. – N. 2. – P. 367-373.
13. Prazdnova, E. V., Mazanko, M. S., Chistyakov, V. A. et al. Effect of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 on the productivity, reproductive aging, and physiological characteristics of hens and roosters //Beneficial microbes. – 2019. – V. 10. – N. 4. – P. 395-412.
14. Prazdnova, E. V., Mazanko, M. S., Bren, A. B., Chistyakov, V. A., Weeks, R., Chikindas, M. L. SOS response inhibitory properties by potential probiotic formulations of *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 obtained by solid-state fermentation //Current microbiology. – 2019. – V. 76. – N. 3. – P. 312-319.
15. Makarenko, M. S., Chistyakov, V. A., Usatov, A. V., Mazanko, M. S., Prazdnova, E. et al. The impact of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 supplementation on telomere length and mitochondrial DNA damage of laying hens //Probiotics and antimicrobial proteins. – 2019. – V. 11. – N. 2. – P. 588-593.

16. Mazanko, M. S., Makarenko, M. S., Chistyakov, V. A., Usatov, A. V., Praznova, E. V. et al. Probiotic intake increases the expression of vitellogenin genes in laying hens //Probiotics and antimicrobial proteins. – 2019. – V. 11. – N. 4. – P. 1324-1329.
17. Emelyantsev, S., Praznova, E., Chistyakov, V., Alperovich, I. Biological Effects of C60 Fullerene Revealed with Bacterial Biosensor—Toxic or Rather Antioxidant? //Biosensors. – 2019. – V. 9. – N. 2. – P. 81.
18. Praznova, E. V.; Gorovtsov, A.V.; Chistyakov, V.A.; Vasilchenko, N.G.; Kukharenko, I. E. The Influence Of Soil Type And Preceding Crop On The Suppression Of *Fusarium* By Indigenous Spore-Forming Bacteria //Periodico Tche Quimica – 2019. – V.16. – N.3. – P. 225-240
19. Fedorenko, G. M., Fedorenko, A. G., Chistyakov, V. A., Praznova, E. V. et al. Method of preparation, visualization and ultrastructural analysis of a formulation of probiotic *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 produced by solid-phase fermentation. // MethodsX. – 2019. – V. 6. – P. 2515-2520.

Статьи и тезисы:

1. Е.В. Празднова, С.В. Демьяненко, В.А.Чистяков, М.А. Шкурат Прогноз системного биологического действия соединений на основе экспресс-тестов на бактериальных биосенсорах // Материалы VI Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) г. Ростов-на-Дону, 15–20 июня 2014 г. С.179.
2. Чурилов М. Н. Накопление мутаций антибиотикоустойчивости под действием лекарств-мутагенов / М. Н. Чурилов, М. С. Мазанко, Е. В. Празднова // Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов: сборник докладов IX международной научной конференции аспирантов и студентов / ДонНТУ, ДонНУ - Донецк: ГУВЗ "ДонНТУ", 2015. - С. 405-407.
3. Мазанко М.С., Празднова Е.В., Чурилов М.Н. Влияние лекарств-мутагенов на частоту появления резистентных к флуконазолу штаммов у дрожжей //Международный научно-исследовательский журнал. – Т. 41. – № 10. – 2015. – С. 102-103
4. Мазанко М.С., Празднова Е.В., Чурилов М.Н., Чистяков В.А. Индуциция мутаций у дрожжей под действием диоксицидина. Материалы VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». г. Ростов-на-Дону, 1–3 октября 2015 г. - С.159-160
5. Конторович А. К., Чистяков В.А., Колмакова Т.С., Празднова Е.В. Влияние митохондриальных антиоксидантов на способность собак к обучению//Лабораторные животные в медицинских и нутрицевтических исследованиях: материалы региональной научно-практической конференции; ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ. – 2015. - С. 58-66

6. П.В. Золотухин, А.А. Беланова, Е.В. Празднова, М.С. Мазанко, М.М. Батюшин, В.К. Чмыхало, В.А. Чистяков. Митохондрии как сигнальный узел и мишень для отключения феноптоза// Биохимия. – 2016. – Т. 81. – №. 4. – С. 465 – 475

7. Мазанко М.С., Макаренко М.С., Покудина И.О., Празднова Е.В., Мосолова Н.И., Пилипенко Д.Н., Усатов А.В., Чистяков В.А. «Можно ли замедлить укорочение теломер животных с помощью пробиотиков? Эксперимент в Волгограде»//XIV Курчатовская молодежная научная школа (8 - 11 ноября 2016 г.) – С.87

8. Мазанко М.С., Празднова Е.В., Буруян В.Н., Чистяков В.А. Влияние времени культивирования на уровень мутагенеза бактерий // Окружающая среда и человек. Современные проблемы генетики, селекции и биотехнологии. Материалы международной научной конференции и молодежной научной конференции памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова (г. Ростов-на-Дону, Россия, 5-8 сентября 2016 г.) Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2016. – С. 542-544.

9. А.В. Рогачева, Е.В. Празднова, М.С. Мазанко, В.А. Чистяков Ингибирование SOS репарации у бактерий// Актуальная биотехнология № 2 (21), 2017. Материалы V международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» 25-29 сентября 2017г., г. Ялта

10. Рогачева А.В., Миндарь М.В., Празднова Е.В., Мазанко М.С., Усатова О.А., Харченко Е.Ю. Ингибирование SOS-репарации у бактерий. Антигенотоксичные свойства растительных экстрактов //Материалы Научно-практической конференции с международным участием (Ростов-на-Дону, 2–4 ноября 2017 г.) "Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции". – Р-н-Д., 2017. – С.124-126

11. Андриянов А.И., Празднова Е.В., Горовцов А.В. Скрининг способности к биопленкообразованию у ризосферных бактерий р. *Bacillus*//Материалы Научно-практической конференции с международным участием (Ростов-на-Дону, 2–4 ноября 2017 г.) "Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции". – Р-н-Д., 2017. - С.46-47

12. Андриянов А. И., Празднова Е. В. Гены семейства NRPS, как возможная генетическая основа антагонистической активности бактерий рода *Bacillus* в отношении грибов рода *Fusarium* //Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. – 2018. – С. 92-94. (Материалы XVIII Всероссийской конференции молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», г. Москва, 19-20.04.2018)

13. Чистяков В.А., Брень А.Б., Макаренко М.С., Празднова Е.В. Использование пробиотических бактерий для продления репродуктивного возраста сельскохозяйственной птицы//Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. – 2018. – С. 234-235. (Материалы XVIII Всероссийской конференции молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», г. Москва, 19-20.04.2018)

14. Празднова Е. В., Андриянов А. И., Васильченко Н. Г. Нерибосомально синтезируемые метаболиты и генетические механизмы их синтеза в реализации фунгицидного эффекта бактерий р. *Bacillus* и *Paenibacillus* (обзор)// «Живые и биокосные системы». – 2018. – № 25

15. Празднова Е.В., Рогачева А.В., Чистяков В.А., Макаренко М.С., Денисенко Ю.В. Замедление репродуктивного старения кур при использовании пищевой добавки на основе пробиотических бактерий рода *Bacillus*//Актуальная биотехнология №3 (26) С.383-386 (Материалы V Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» 7-21 сентября 2018 г., г. Ялта)

16. Чистяков В.А., Усатов А.В., Чикиндас М.Л., Брень А.Б., Макаренко М.С., Празднова Е.В., Мазанко М.С. Использование пробиотических бактерий для продления репродуктивного возраста сельскохозяйственной птицы//Материалы Международной научно-практической конференции «Инновационные направления в кормлении сельскохозяйственной птицы» 6-7.06.2018, г.Волгоград

Патенты:

1. Чистяков Владимир Анатольевич, Празднова Евгения Валерьевна Чмыхало Виктор Константинович, Брень Анжелика Борисовна, Белик Тимур Викторович, Мазанко Мария Сергеевна. Способ определения генотоксичности химических веществ. Патент РФ № 2614122 от 12.01.16

2. Чистяков Владимир Анатольевич, Празднова Евгения Валерьевна, Мазанко Мария Сергеевна, Белик Тимур Викторович, Чмыхало Виктор Константинович, Брень Анжелика Борисовна. Способ определения токсичности химических веществ, генерирующих активные формы кислорода. Патент РФ № 2614267 от 12.01.2016.

3. Чистяков Владимир Анатольевич, Сазыкина Марина Александровна, Сазыкин Иван Сергеевич, Празднова Евгения Валерьевна. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ *Deinococcus radiodurans*. Патент РФ № 2560598 от 27.01.2015

Свидетельства о регистрации баз данных и программ для ЭВМ:

1. Свидетельство №20536, № ВНТИЦ 50201450791. Празднова Е.В., Мазанко М.С., Чмыхало В.К. База данных способности лекарств-мутагенов индуцировать экспрессию оперонов SOS-репарации и окислительного стресса у бактерий. 20.11.2014

2. Свидетельство №20537, № ВНТИЦ 50201450792. Чистяков В.А., Празднова Е.В. Определение уровня индукции бактериальных стресс-оперонов с помощью люминесцентных биосенсоров. 20.11.2014

3. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2014663199. Чистяков В.А., Празднова Е.В. Биолюминесцентный тест на стресс-индуцируемую экспрессию бактериальных оперонов и токсичность. 18.12.2014

4. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2014621740. Празднова Е.В., Мазанко М.С., Чмыхало В.К. База данных по индукции экспрессии оперонов SOS-репарации и окислительного стресса у бактерий под действием лекарств-мутагенов (диоксидина, нитрофуранов и цисплатины). 18.12.2014

5. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2015621633. Празднова Е.В., Покудина И.О., Мазанко М.С., Шкурат М.А., Денисенко Ю.В. База данных по резистентности к антибиотикам изолятов бактерий р. *Esherichia* и р. *Klebsiella*, выделенных от амбулаторных пациентов г. Ростова-на-Дону 09.11.2015

6. Мазанко М.С., Покудина И.О., Празднова Е.В., Чистяков В.А., Брень А.Б., Денисенко Ю.В. База данных по резистентности к антибиотикам изолятов грибов р. *Candida*, выделенных от амбулаторных пациентов г. Ростова-на-Дону. Свидетельство о гос. регистрации № 2016621488 Приоритет 29.09.16 Регистрация 7.11.16

7. Мазанко М. С., Покудина И. О., Денисенко Ю. В., Рогачева А. В., Празднова Е. В., Чурилов М.Н., Чистяков В.А. База данных встречаемости различных типов генов устойчивости к пенициллину и цефалоспоринам в клинических изолятах *E. coli* и *Klebsiella sp.*, выделенных от амбулаторных пациентов г. Ростова-на-Дону Номер свидетельства – 2017621455 от 11.12.2017.

Список обозначений и сокращений

m/z – величина отношения массы иона пептида к его заряду

MS, MC – масс-спектрометрия

MS/MS, MC/MC – tandemная масс-спектрометрия

Orbitrap - масс-спектрометр высокого разрешения с ловушкой орбитального типа

ВЭЖХ-МС/МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

RT – retention time – время удерживания

АФК – активные формы кислорода

БКС – бесклеточный супернатант

НРПС – нерибосомальные пептид-синтазы

ПКС – поликетид-синтазы