

*На правах рукописи*



**ЦВETИКОВА СОФЬЯ АНДРЕЕВНА**  
**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**  
**БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА КОЛАНОВОЙ**  
**КИСЛОТЫ**

1.5.4 – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2024

Работа выполнена в Химико-биологическом кластере Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО».

Научный руководитель: **Кошель Елена Ивановна**  
кандидат биологических наук, доцент Химико-биологического кластера, заведующая лабораторией ДНК-наносенсорной диагностики ФГАОУВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: **Абдуллаев Серажутдин Абдуллаевич**  
доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

**Татарский Виктор Вячеславович**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва

Ведущая организация: ФГБУН **Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»**, г. Сыктывкар

Защита диссертации состоится «24» декабря 2024 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.108.03 при ФГБУН Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии РАН (ФИЦ ПХФ и МХ РАН) по адресу: 142432, Московская обл., г. Черноголовка, Северный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИЦ ПХФ и МХ РАН (142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр-т академика Семенова, д. 1) и на официальном сайте <https://icp-ras.ru/>. Текст автореферата размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу <http://vak3.minobrnauki.gov.ru/>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета 24.1.108.03,  
канд. биол. наук



Аникина Лада Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Бактериальные метаболиты являются источником новых потенциальных препаратов и пищевых добавок. Среди метаболитов особый интерес вызывают бактериальные полисахариды, обладающие широким спектром действия – помимо структурной и защитной функции для бактерий, они могут обладать антипролиферативными, антиоксидантными и иммуномодуляторными свойствами. При этом полисахариды обладают высокой биосовместимостью и являются гидрофильными, что создает широкий потенциал применения в биомедицине. Однако сложность и разнообразие структуры полисахаридов, многоэтапность биологического и химического синтеза, многокомпонентная регуляция экспрессии ограничивают их применение и становятся препятствием в изучении.

Большинство бактериальных полисахаридов входят в состав оболочки клетки (липополисахариды (ЛПС), капсульные полисахариды) и матрикса биопленок (экзополисахариды (ЭПС)). Биологические свойства полисахаридов зависят от их моносахаридного состава, наличия дополнительных групп, разветвленности и молекулярного веса. Капсульные полисахариды и ЛПС связаны в основном с патогенными свойствами бактерий и вирулентностью, в то время как ЭПС защищают бактерий от условий внешней среды. Помимо выполнения функций для бактериальной клетки, многие полисахарида могут оказывать непосредственное воздействие на организм человека, что интенсивно исследуется в основном в трех направлениях. Первое – поиск бактериальных полисахаридов, обладающих антипролиферативной активностью, что может быть использовано в разработке противоопухолевых препаратов. Второе – исследование биоактивных свойств полисахаридов кишечной микробиоты, в т.ч. иммуномодулирующих (к примеру, у полисахарида А, продуцируемого *Bacteroides fragilis*). Третье – исследование возможности использования полисахаридов в качестве матрикса для ранозаживляющих повязок и 3D печати биосовместимых структур (к примеру, бактериальной целлюлозы). Очевидно, что обширное разнообразие структуры, высокая биосовместимость и проявление биоактивных свойств полисахаридов формируют возможность их применения в биомедицине.

Одним из таких полисахаридов, привлечших значительное внимание исследователей в последние годы, является колановая кислота (КК). Полисахарид впервые был описан в 1963 году и долгое время рассматривался как один из структурных компонентов бактериальных

био пленок и капсул. В 2017 году впервые были описаны его биологические свойства в модели нематод и дрозофил. Исследования показали, что КК при пероральном получении или продукции кишечными симбионтами способна увеличивать продолжительность жизни беспозвоночных животных (нематод, дрозофил) и снижать проявление ассоциированных с возрастом изменений в этих моделях, влиять на динамику митохондрий и митохондриальный ответ на неправильно свернутые белки (mitochondrial unfolded protein response (UPRmt)). Исследования влияния КК на млекопитающих проводились ограниченно и демонстрировали ее иммуногенную активность в инъекциях, но эффекты от перорального введения ранее описаны не были. Кроме того, КК является важным компонентом бактериальных био пленок, играющих значительную роль в инфекционных и неинфекционных заболеваниях. Изучение ее влияния на клетки млекопитающих может расширить представления о биологических свойствах, в том числе для млекопитающих.

Для оценки потенциала применения КК в качестве биоактивного вещества необходимо провести исследования, подтверждающие безопасность вещества и описывающие его эффекты на моделях млекопитающих. Таким образом, исследование влияния КК на различные типы клеточных линий и ее эффекты при пероральном введении животным поможет оценить ее потенциал в биомедицине и безопасность применения.

**Степень разработанности темы исследования.** Впервые КК была описана доктором В. Ф. Гебелем в 1963 году, указавшем на ее ассоциацию с мукоидным фенотипом штаммов *Escherichia coli*. В дальнейшем КК рассматривалась как структурный полисахарид, входящий в состав капсул и матрикса био пленок. В недавнем исследовании было показано, что КК продуцируется представителями комменсальной микробиоты нематод *Caenorhabditis elegans*, причем повышение экспрессии КК коррелирует с увеличением продолжительности жизни червей и снижением проявления возраст-ассоциированных изменений, в том числе индуцированных мутациями. Авторы показали подобный эффект и для *Drosophila melanogaster*, а также предварительно выявили, что механизм воздействия КК может быть реализован с участием митохондрий. В дальнейшей работе те же авторы разработали штамм *E. coli*, синтез КК в котором контролируется оптогенетически. Уровень экспрессии КК влиял на увеличение продолжительности жизни нематод, а также на фрагментацию митохондрий.

Несмотря на интригующие свойства полисахарида КК, выявленные на беспозвоночных, более детальное изучение эффектов на клеточных линиях

или исследования на других моделях животных не проводились. Существует только единичное упоминание о возможном синтезе КК микробиотой млекопитающих, которому противоречат данные об индукции синтеза КК при снижении температуры окружающей среды до 19 °С. Кроме того, не проводились работы по оценке влияния КК на организм млекопитающих при пероральном введении, оценивались только свойства при внутривенных и внутрибрюшинных инъекциях. Для дальнейшего изучения биологических свойств КК в организме млекопитающий необходимо проведение исследований токсичности и анализ эффектов КК в *in vitro* и *in vivo* моделях.

### **Цель и задачи исследования.**

**Целью диссертационной работы** является исследование эффектов КК *in vitro* и *in vivo*, включая влияние на жизнеспособность клеточных линий различного происхождения, субхроническую токсичность и физическую активность мышей. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Оптимизировать протоколы культивирования продуцента, выделения и очистки КК.
2. Определить диапазоны концентрации КК, не снижающих жизнеспособность клеточных линий различного происхождения.
3. Проанализировать влияние КК на морфологию клеток, жизнеспособность которых изменяется в присутствии КК.
4. Оценить влияние КК на процессы, сопровождающие дифференцировку клеток линии миоцитов мыши.
5. Оценить субхроническую токсичность КК на модели мышей и ее влияние на физическую активность.
6. Описать изменения ультраструктуры миокарда мышей, получавших КК в эксперименте.

**Научная новизна работы.** Впервые проведен комплексный анализ цитотоксичности КК в нескольких клеточных линиях и субхронической токсичности на мышцах. Выявлено, что КК обладает слабой антипролиферативной активностью в отношении клеточных линий опухолевого происхождения (НСТ-116, IMR-32), при этом жизнеспособность клеточных линий не опухолевого происхождения не снижается. Показано влияние КК на морфологию клеток и расположение митохондрий. Установлено, что КК влияет на дифференцировку клеточной линии миоцитов мыши в клеточной линии С2С12. Получены новые данные о влиянии КК на количество активных митохондрий и содержание активных

форм кислорода (АФК) в клеточной линии миоцитов мыши C2C12. Впервые была проведена оценка безопасности применения КК на животных при пероральном получении. Впервые описано влияние КК на физическую активность мышей в плавательном тесте. Оптимизирован протокол выделения КК с этапом очистки от белков из штамма-сверхпродуцента гидроксibuтирата.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В исследовании впервые комплексно оценены *in vitro* и *in vivo* биологические эффекты бактериального полисахарида КК, имеющего значительный потенциал в биомедицине. Разработанный протокол культивирования, выделения и очистки КК может быть использован при производстве препаратов и пищевых добавок КК для медицины и сельского хозяйства. Выявленные антипролиферативные свойства могут стать основой для разработки новых препаратов на основе полисахаридов и их конъюгатов. Способность стимулировать физическую активность может быть применена при разработке препаратов для реабилитации и терапии ожирения, при этом низкая токсичность КК позволяет рассмотреть возможность применения в различных областях. Результаты исследования биологических свойств КК, ее влияния на митохондрии и пролиферацию клеток, а также на поведение животных, являются важными для использования полисахаридов в разработке новых препаратов и добавок.

**Методология и методы исследования.** В работе использовали штамм-продуцент КК, выделение полисахарида происходило в несколько этапов с последовательной очисткой. Анализ полученного образца проводился методом газовой хроматографии-масс спектрометрии (ГХ-МС). Цитотоксичность КК оценивалась на пяти клеточных линиях различного происхождения (HCT-116, IMR-32, Vero, HPF, C2C12) в МТТ-тесте. Другие клеточные эффекты КК, в том числе влияние на дифференцировку клеток, количество метаболически активных митохондрий и содержание АФК проводилось в линии миоцитов мыши C2C12 и оценивались методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Исследование субхронической токсичности и влияния КК на физическую активность животных проводилось на аутбредных мышках ICR(CD-1). Дополнительно было проведено исследование ультраструктурных особенностей миокарда желудочков сердца мышей с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

## **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Полисахарид КК в концентрациях от 1 до 128 мкг/мл не снижает жизнеспособность всех исследуемых клеточных линий, однако ее добавление в максимальной концентрации 256 мкг/мл приводит к снижению жизнеспособности линий С2С12, IMR-32, НСТ-116.

2. КК индуцирует изменения в морфологии линии миоцитов С2С12, характерные для миогенной дифференцировки.

3. Добавление КК приводит к изменениям метаболической активности митохондрий, ассоциированным с дифференцировкой клеток линии С2С12.

4. КК обладает низкой субхронической токсичностью при использовании дозировок от 0,1 до 1 мг/г в течение 30 дней и не вызывает гибели лабораторных мышей. При этом с увеличением дозы отмечается увеличение относительной массы сердца и печени, уменьшение относительной массы почек.

5. Пероральный прием КК лабораторными мышами приводит к увеличению времени заплыва в плавательном тесте в течение первых семи дней исследования, однако в дальнейшем этот эффект пропадает.

6. При воздействии на организм КК у животных отмечается проявление митофагии в клетках миокарда желудочков сердца.

**Степень достоверности и апробация материалов диссертации.** Работа проводилась в Университете ИТМО и Ивановской государственной медицинской академии (ИвГМА). Все протоколы экспериментов с животными были утверждены локальным этическим комитетом ИвГМА. Результаты всех экспериментов были получены с использованием современного оборудования и общепринятых биологических моделей. Достоверность полученных результатов подтверждается представленными первичными данными и описанием статистической обработки.

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, среди которых 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, и цитируемых в зарубежных базах данных (Scopus, Web of Science) и 6 публикаций с материалами, представленными на всероссийских и международных научных конференциях.

Результаты диссертации были частично ранее представлены в магистерской диссертации автора работы (Победитель конкурса дипломных работ Университета ИТМО). По результатам выполнения исследования был

получен грант Комитета по науке и высшей школы (КНВШ) Санкт-Петербурга.

**Личный вклад автора.** Все описанные в работе экспериментальные процедуры, за исключением содержания животных, были проведены автором лично или с его участием. Анализ полученных данных полностью выполнен автором. Анализ образцов КК проведен методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) в лаборатории химии полисахаридов (сейчас - Лаборатория углеводов и биоцидов им. академика Н.К. Кочеткова, Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН) под руководством Сенченковой С.Н. Исследования на модели мышей проведены в ИвГМА под руководством Криштопа В.В. Исследование ультраструктуры миокарда мыши было выполнено с участием Брагиной Е.Ю. в НИИ физической и химической биологии им. А.Н. Белозерского (МГУ им. М.В. Ломоносова).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с изложением и обсуждением результатов собственных исследований, заключения, списка литературы и списка сокращений. Диссертация изложена на 103 страницах, иллюстрирована 17 таблицами и 25 рисунками. Список литературы включает 142 источника.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В обзоре литературы рассмотрены основные механизмы влияния бактериальных полисахаридов на клеточные культуры и животных. Приведены данные об истории изучения КК, ее синтеза и роли в бактериальных клетках. Проведен анализ эффектов КК в клеточных линиях и животных моделях.

### **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Получение КК из бактериальной культуры.** В работе использовался штамм-сверхпродуцент *E. coli* S17-3 pBhya-CAB. Культивирование проводили в модифицированной среде LB при pH 4,5 и 6,5. Было разработано 5 протоколов выделения и очистки (Таблица 1). Анализ моносахаридного состава образцов КК проводили методом ГХ-МС.

Таблица 1. Протоколы выделения КК.

Протокол № 1	Протокол № 2	Протокол № 3	Протокол № 4	Протокол № 5
pH = 4,5	pH = 6,5			pH = 4,5
Белки с ТХУ не удалялись				Белки были осаждены с ТХУ
Осаждение полисахаридов этанолом (95 %), 3:1	Осаждение полисахаридов этанолом (95 %), 3:1	Осаждение полисахаридов этанолом (95 %), 4:1	Осаждение полисахаридов ацетоном (98 %), 3:1	Осаждение полисахаридов этанолом (95 %), 3:1

**Клеточные линии.** В работе использовали пять клеточных линий: линии колоректального рака (HCT-116), нейробластомы человека (IMR-32), постнатальные фибробласты человека (HPF), миоцитов мыши (C2C12) и культура эпителия почки зеленой мартовшки (Vero). В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста.

**МТТ-тест.** Жизнеспособность клеток оценивали с использованием красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид. Количество живых и метаболически активных клеток оценивали по оптической плотности растворенного в ДМСО восстановленного красителя при длине волны 570 нм на планшетном ридере Tecan Infinite.

**Флуоресцентная микроскопия.** Для анализа морфологии клеток линий C2C12, HCT-116 и IMR-32 клетки после культивирования с КК окрашивали красителями DAPI и MitoTracker™ Red CMXRos. Изображения были получены на микроскопе Leica DMi8 с камерой Leica DFC365FX (Leica, Германия) в родаминовом (585/40 нм) и DAPI (460/50 нм) каналах. Анализ изображений выполняли в программе ImageJ 1.54j 12, анализировали не менее 20 полей зрения.

**Проточная цитофлуориметрия.** Для клеточной линии C2C12 дополнительно оценивали кинетику гибели клеток (окрашивание пропидий иодидом, PI), мембранный потенциал митохондрий (окрашивание MitoTracker Red CMXRos) и формирование АФК (окрашивание CM-H<sub>2</sub>DCFDA). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, USA). Данные анализировали с использованием программы CytExpert (Beckman Coulter, USA).

**Животные.** Исследование проводилось на самках аутбредных мышей ICR(CD-1) в возрасте 4 месяцев и массой тела 22 ± 0,3 г. Животные содержались в виварии ИВГМА.

**Анализ субхронической токсичности.** Мыши были случайным образом распределены на 5 групп (контрольная и четыре экспериментальные), по пять животных в группе. Экспериментальные группы получали по 0,1 мг, 0,5 мг, 0,75 мг и 1 мг на 1 г веса животного. Состояние покровов, масса тела, пищевое и питьевое поведение оценивалось в течение 30 дней. Поскольку животные в эксперименте не погибли, мышей выводили из эксперимента инъекцией золетила и ксилазина, при этом извлекали и взвешивали печень, сердце и почки. Для внутренних органов рассчитывали относительную массу как отношение массы органа к массе тела животного.

**Оценка влияния КК на физическую активность животных в тесте вынужденного плавания.** Животные были разделены на две группы (контрольная и экспериментальная), по 15 мышей в каждой. Экспериментальная группа получала КК в максимальной концентрации (1 мг на 1 г массы тела, или около 22 мг в сутки). Для оценки силы и выносливости животных использовали плавательный тест с нагрузкой, модифицированный по рекомендациям Научного центра биомедицинских технологий ФМБА. Проводилась оценка продолжительности первого заплыва и отношения продолжительности последнего заплыва к первому. Эксперимент длился 18 дней, измерения проводились в первый, третий, седьмой и восемнадцатый день.

**Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) желудочков сердца мыши.** По окончании исследования влияния КК на физическую активность животных усыпляли и подвергали диссекции по описанной процедуре. При диссекции фрагменты левых желудочков сердца фиксировали в растворе глутарового альдегида. Изображения были получены на высоковольтном микроскопе H-700Y Hitachi (200кВ). Анализ изображений проводили с использованием ImageJ 1.54j 12, оценивался размер лизосом и митохондрий.

**Статистика.** Все эксперименты на клетках выполняли в трех повторностях, рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. При анализе изображений исследуемые параметры оценивали не менее чем в 20 полях зрения, оценивали среднее значение и стандартное отклонение. Значимость различий определяли с использованием t-критерия Стьюдента. В исследовании на животных для каждого показателя определяли среднее значение и стандартное отклонение. Достоверность различий оценивалась с использованием теста Краскела-Уоллиса и критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферони на множественное сравнение.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Оптимизация протокола выделения КК

Было разработано пять протоколов выделения и очистки КК. Полученные образцы отличались между собой визуально (цвет, текстура) и по моносахаридному составу. Для дальнейших исследований был выбран протокол №5, несмотря на то что выход КК в нем получен меньше, чем в других протоколах (213,8 мг/л), но образец наиболее чистый. Выбранный протокол отличается от других сочетанием поддержания рН 4,5 во время культивирования, наличием этапа осаждения белков с ТХУ, осаждением полисахаридов 95% этанолом (3:1). Полученный образец представляет собой белое волокнистое вещество, растворимое в воде, характеризуется наличием фукозы, глюкозы и галактозы в моносахаридном составе.

### 3.2. Исследование биологических эффектов КК *in vitro*

#### 3.2.1. Оценка жизнеспособности клеточных линий в присутствии КК

Жизнеспособность клеточной культуры С2С12 снижалась при концентрации КК 256 мкг/мл до 70%. Две из пяти исследуемых клеточных линий (Vero, HPF) не показали значительного снижения жизнеспособности при добавлении КК (Рисунок 1).

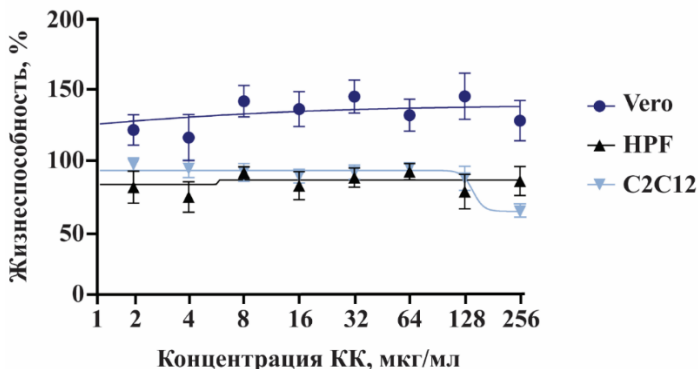


Рисунок 1 – Влияние КК на жизнеспособность клеток Vero (синий круг), HPF (черный треугольник) и C2C12 (голубой треугольник). За 100 % жизнеспособность принято значение оптической плотности при культивировании без КК.

Наблюдается снижение жизнеспособности клеточных линий НСТ-116 и IMR-32 при концентрации 256 мкг/мл – до 85 %. Предположительно, это связано с антипролиферативными свойствами КК в отношении клеток опухолевого происхождения. Такие свойства проявляются у многих полисахаридов микробного происхождения.

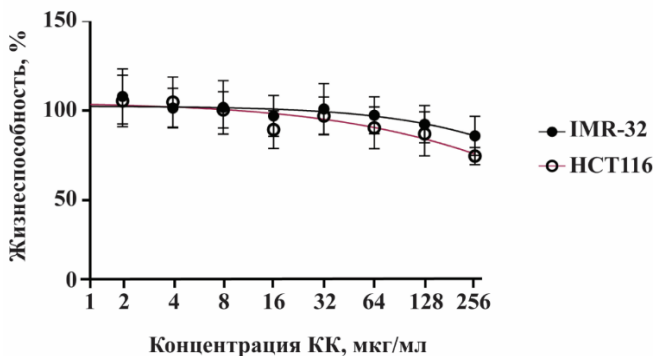


Рисунок 2 – Влияние КК на жизнеспособность клеток IMR-32 (темный круг) и НСТ-116 (белый круг). За 100 % жизнеспособность принято значение оптической плотности при культивировании без КК.

### 3.2.2. Анализ влияния КК на морфологию клеток

При культивировании с КК (200 мкг/мл) в клеточной линии С2С12 наблюдалось изменение морфологии: клетки становились более вытянутыми (увеличение отношения длины к ширине с  $2,2 \pm 0,9$  до  $4,3 \pm 2,3$ ) и формировались отростки, ядра выстраивались в одну линию. Это типичные признаки дифференцировки клеток по пути миогенеза и превращения в мышечные трубочки (рисунок 3). Анализ, проведенный на клеточных линиях опухолевого происхождения, также показавших снижение жизнеспособности (НСТ-116, IMR-32), не показал изменения морфологии клеток.

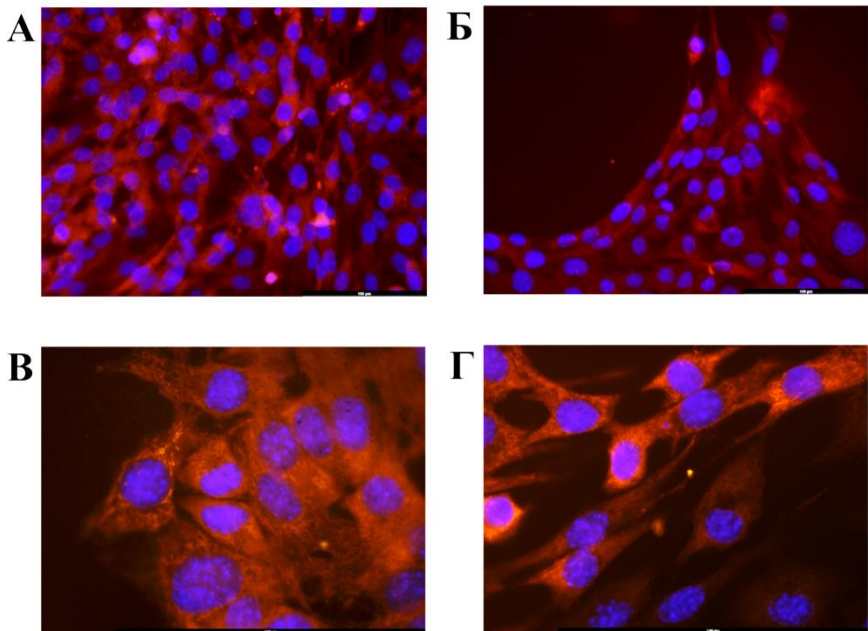


Рисунок 3 - Изменение морфологии клеток миоцитов линии C2C12 при культивировании с КК в концентрации 200 мкг/мл (Б – увеличение 20х, Г – увеличение 100х). Культура в контроле: А – увеличение 20х, В – увеличение 100х.

### 3.2.3. Анализ влияния КК на клеточную гибель в линии миоцитов

Результаты измерения размеров популяций клеток методом проточной цитометрии с флуоресцентным красителем PI показали, что использование КК в максимальной концентрации (200 мкг/мл) увеличило количество мертвых клеток с 2,14 % до 11,36 % через 24 часа с момента начала культивирования с КК, что является значительным увеличением и коррелирует с результатами МТТ. При использовании средней концентрации (50 мкг/мл) значительного увеличения числа погибших клеток не наблюдается. Полученные результаты могут быть связаны как с цитотоксичностью КК при использовании максимальной исследованной концентрации, так и с увеличением количества погибших клеток при дифференцировке миоцитов.

### 3.2.4. Анализ количества активных митохондрий и формирования АФК в клеточной линии миоцитов в присутствии КК

Оценка уровня АФК в клетках проводилась с использованием флуоресцентного красителя CM-H2DCFDA. При использовании КК в концентрации 50 мкг/мл отмечается увеличение медианы сигнала в 1,6 раз (4403,7 CM-H2DCFDA в контроле и 7137,1 CM-H2DCFDA при 50 мкг/мл КК), однако при использовании КК в концентрации 200 мкг/мл значение снижается до 4135,2 CM-H2DCFDA. Повышенная продукция АФК является характерной чертой процесса дифференцировки миоцитов линии C2C12, при этом снижение количества АФК при максимальной концентрации КК может свидетельствовать о слабой антиоксидантной активности КК, ранее описанной для других полисахаридов с высоким содержанием фукозы.

Количество активных митохондрий измеряли методом проточной цитометрии и окрашивания красителем MitoTracker™ Red CMXRos, зависимым от митохондриального потенциала. При добавлении КК происходит увеличение количества активных митохондрий (сдвиг пика на графике вправо). Изменяется и значение медианы: 13734,2 в контроле, 28840,2 и 29440,2 при культивировании с 50 и 20 мкг/мл КК соответственно. При использовании обеих концентраций (50 и 200 мкг/мл) наблюдалось увеличение количества активных митохондрий, что подтверждает влияние КК на митохондрии и коррелирует с результатом, полученным при измерении уровня АФК.

### **3.3. Исследование влияния КК на организм мышей**

#### **3.3.1. Оценка субхронической токсичности КК**

КК не вызвала проявлений токсичности при минимальной дозировке (0,1 мг на 1 г массы тела), однако привела к изменению массы органов и состояния шерсти при более высоких концентрациях (0,75 и 1 мг/г). При этом внешние признаки токсичности (появление зон алопеции) проявлялись, начиная с 18–22 дня наблюдения, что указывает на накопительный токсический эффект. Таким образом, КК можно считать малотоксичной, а ее эффект дозозависимым.

Эффектом, характерным для проявления токсичности, было появление зон алопеции и изменение состояния шерсти в группах, получавших КК в дозах 0,5, 0,75 и 1 мг/г с 18–22 дня эксперимента. В группе, получавшей среднюю концентрацию КК изменение состояния меха (взъерошенность), проявилось на 15 день наблюдения, зоны алопеции проявились на 22 день. В группе, получавшей высокие дозы КК (0,75 и 1 мг/г), первые признаки изменения меха проявлялись на 7 день наблюдения, зоны алопеции проявлялись на 18 день наблюдения. Однако при этом у всех животных сохранялось нормальное пищевое и питьевое поведение и высокий уровень

физической активности (оценка влияния КК на физическую активность проводилась в отдельном эксперименте).

Масса тела животных измерялась 3 раза в неделю во все время наблюдения. В начале исследования масса животных во всех группах не отличалась от массы животных в контрольной группе ( $22,1 \pm 0,3$  г). Так как для эксперимента были выбраны животные в возрасте 4 месяцев, увеличение массы тела во всех группах связано с ростом. Однако при этом динамика изменения массы тела у животных, получавших КК, отличается от контрольной группы (рисунок 4). Резкие изменения массы тела в сравнении с равномерным увеличением массы тела в контрольной группе могут быть связаны с нарушением регуляции обмена веществ. Кроме того, как нарушения метаболизма, так и токсический эффект могут быть связаны с воздействием на мочевыделительную систему (наблюдалось повышенное употребление жидкости и учащенное мочеиспускание).

В группе, получавшей максимальные дозы КК 0,75 и 1 мг/г, отмечается снижение массы тела в сравнении с контрольной группой с 3 по 9 сутки эксперимента до  $21,5 \pm 0,4$  г и  $19,1 \pm 0,5$  г соответственно. В дальнейшем происходило увеличение массы до 16 суток (до  $26,2 \pm 0,3$  г и  $23,3 \pm 0,5$  соответственно). После этого в группе, получавшей 1 мг/г КК, происходило резкое снижение массы тела на 19 сутки до  $20,1 \pm 0,5$  г с последующим увеличением до  $23,2 \pm 0,4$  г к завершению исследования. В группе, получавшей 0,75 мг/г, снижение массы тела после 16 суток происходило медленнее, масса тела достигла  $23,7 \pm 0,5$  г к 22 суткам эксперимента. В дальнейшем масса животных достигла  $25,8 \pm 0,5$  г к окончанию эксперимента.

Для мышей, получавших 0,5 мг/г мг КК, отмечалась схожая динамика изменений (рисунок 4 (синий)): увеличение массы тела происходило до 19 суток (до  $31,1 \pm 0,4$  г), затем следовало снижение массы на 22 сутки до  $23,7 \pm 0,5$  г с последующим увеличением до  $31,7 \pm 0,4$  г. При этом большую часть исследования масса тела значимо ( $p < 0,05$ ) отличалась от массы тела животных в контрольной группе, кроме первых 5 суток, 9 и 14 суток.

Динамика изменений массы тела мышей, получавших 0,1 мг/г, отличалась от других групп (рисунок 4 (зеленый)). Увеличение массы тела происходило до 9 суток (до  $26,2 \pm 0,2$  г), причем с 5 суток масса была выше, чем в контрольной группе ( $23,2 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ). На 11 сутки фиксировалось резкое снижение массы тела до  $20,7 \pm 0,2$  г, что ниже, чем в контрольной группе ( $25,1 \pm 0,2$  г,  $p < 0,05$ ). Начиная с 16 суток отмечали увеличение массы тела до  $26 \pm 0,4$  г, что ниже массы тела в контрольной группе ( $30 \pm 0,3$  г,  $p < 0,05$ ).

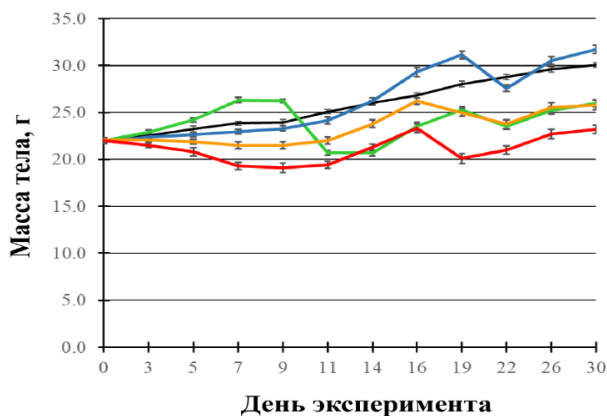


Рисунок 4 - Динамика изменения массы тела животных в исследовании субхронической токсичности. Цветом выделены группы (по 5 мышей в группе): контрольная (черный), минимальная доза (0,1 мг/г; зеленый), средняя доза (0,5 мг/г; синий), высокая доза (0,75 мг/г; оранжевый), максимальная доза (1 мг/г; красный). Для каждой точки показано значение стандартного отклонения.

### 3.3.2. Изменение массы внутренних органов мышей при получении КК

При оценке массы сердца важно учитывать массу тела, поэтому для всех животных была рассчитана относительная масса органа. Было выявлено, что статистически значимое увеличение относительной массы сердца отмечалось для групп, получавших высокую (0,75 мг/г) и максимальную (1 мг/г) дозу КК. Таким образом, КК оказывает дозозависимое влияние на относительную массу сердца (таблица 2).

Таблица 2 – Масса и относительная масса сердца в группах животных (n = 5) с указанием стандартного отклонения. Доза КК указана из расчета на 1 г массы тела животного. Достоверность различий с контролем оценивалась с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение.

Доза КК, мг в сутки	Масса сердца, г	Относительная масса сердца, %
0 мг/г	0,18 ± 0,01	0,59 ± 0,04
0,1 мг/г	0,15 ± 0,01 (p = 0,138)	0,58 ± 0,07 (p = 1)
0,5 мг/г	0,21 ± 0,02 (p = 0,293)	0,66 ± 0,09 (p = 0,829)
0,75 мг/г	0,2 ± 0,01 (p = 0,13)	0,77 ± 0,04 (p = 0,044)
1 мг/г	0,2 ± 0,01 (p = 0,06)	0,87 ± 0,05 (p = 0,044)

Согласно результатам взвешивания, масса печени статистически значимо увеличена во всех экспериментальных группах, кроме группы, получавшей минимальную дозу 0,1 мг/г. При анализе относительной массы печени также отмечено увеличение массы органа в тех же группах по сравнению с контрольной группой, причем оно имеет дозозависимый характер. Однако относительная масса печени мышей, получавших минимальную дозу КК (0,1 мг/г) не отличалась от контрольной группы (Таблица 3).

Таблица 3 – Масса и относительная масса печени в группах животных (n = 5) с указанием стандартного отклонения. Доза КК указана из расчета на 1 г массы тела животного. Достоверность различий с контролем оценивалась с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение.

Доза КК, мг/сутки	Масса печени, г	Относительная масса печени, %
0 мг/г	1,42 ± 0,09	4,73 ± 0,37
0,1 мг/г	1,42 ± 0,12 (p = 1)	5,45 ± 0,62 (p = 0,38)
0,5 мг/г	1,81 ± 0,18 (p = 0,032)	5,71 ± 0,71 (p = 0,048)
0,75 мг/г	1,71 ± 0,14 (p = 0,048)	6,64 ± 0,63 (p = 0,048)
1 мг/г	1,66 ± 0,13 (p = 0,048)	7,16 ± 0,7 (p = 0,032)

Согласно результатам взвешивания почек, их масса значительно снижалась в группах, получавших максимальную дозу КК (0,75 и 1 мг/г). При учете массы тела животных и расчете относительной массы органов, было выявлено, что статистически значимые изменения в сравнении с контрольной группой также наблюдаются только для животных, получавших 0,75 и 1 мг/г (Таблица 4).

Таблица 4 – Масса и относительная масса почек в группах животных (n = 5) с указанием стандартного отклонения. Доза КК указана из расчета на 1 г массы тела животного. Достоверность различий с контролем оценивалась с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение.

Доза КК, мг/сутки	Масса почек, г	Относительная масса почек, %
0 мг/г	0,38 ± 0,02	1,27 ± 0,09
0,1 мг/г	0,33 ± 0,02 (p = 0,138)	1,27 ± 0,09 (p = 0,917)
0,5 мг/г	0,37 ± 0,04 (p = 1)	1,17 ± 0,15 (p = 0,251)
0,75 мг/г	0,2 ± 0,034 (p = 0,032)	0,92 ± 0,14 (p = 0,009)
1 мг/г	0,18 ± 0,03 (p = 0,032)	0,79 ± 0,18 (p = 0,009)

### 3.3.3. Оценка влияния КК на физическую активность мышей

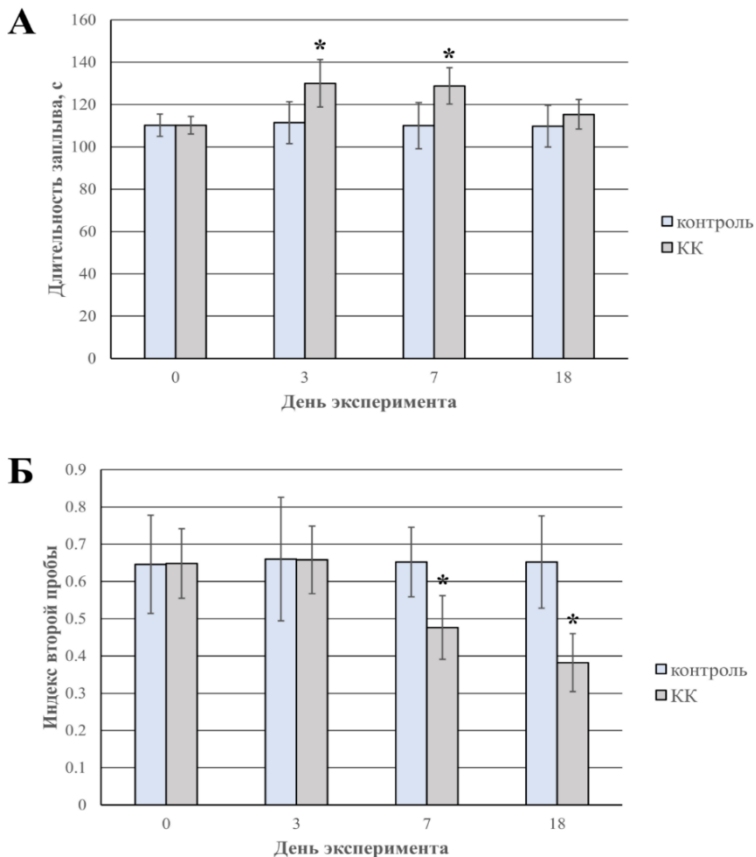


Рисунок 5 – Результаты теста вынужденного плавания с нагрузкой. Контрольная группа (синий цвет,  $n = 15$ ), экспериментальная группа (красный,  $n = 15$ ) получала КК 1 мг/г. На верхнем графике (А) отражено среднее время первого заплыва (в секундах) в начале эксперимента и на 3, 7 и 18 день, на нижнем (Б) – индекс второй пробы.

Так как в исследовании субхронической токсичности КК наблюдалась повышенная физическая активность животных, для оценки стимулирующего эффекта КК был проведен эксперимент для оценки силы и выносливости животных в плавательном тесте с тремя этапами. Было выявлено, что в первые 7 дней время заплыва в первом этапе увеличивается (3 и 7 день измерения, до  $130 \pm 11,2$  с и  $128,8 \pm 8,6$  с соответственно,  $p < 0,05$ ), что показывает увеличенную силу животных (рисунок 5, А).

Соотношение времени последнего и первого заплыва использовалось как показатель выносливости животных при длительной нагрузке. В соответствии с рекомендациями, значение индекса менее 0,5 указывает на низкую способность к восстановлению после физической нагрузки. В течение эксперимента индекс снижался, составив на 7 и на 18 день менее 0,5 (7 день  $0,48 \pm 0,09$ , 18 день  $0,38 \pm 0,08$ ,  $p < 0,05$ ) (рисунок 5, Б).

В целом результаты показывают, что полученный препарат КК может кратковременно увеличивать силу животных в сравнении с контролем (первый этап плавательного теста), но также связан со снижением индекса соотношения времени заплыва на разных этапах, что может быть показателем снижения выносливости.

### 3.3.4. Влияние КК на ультраструктуру миокарда желудочков сердца мыши

Ультраструктурный анализ (рисунок 6, таблица 5) кардиомиоцитов выявил, что в экспериментальной группе в цитоплазме кардиомиоцитов отмечалось большее количество и объем вакуолей с остатками митохондрий внутри ( $p < 0,05$ ), что указывает на активацию митофагии в кардиомиоцитах под влиянием КК. При этом для обеих групп отмечается нормальная исчерченность и расположение межклеточных контактов кардиомиоцитов, отсутствуют различия в морфологии митохондрий.

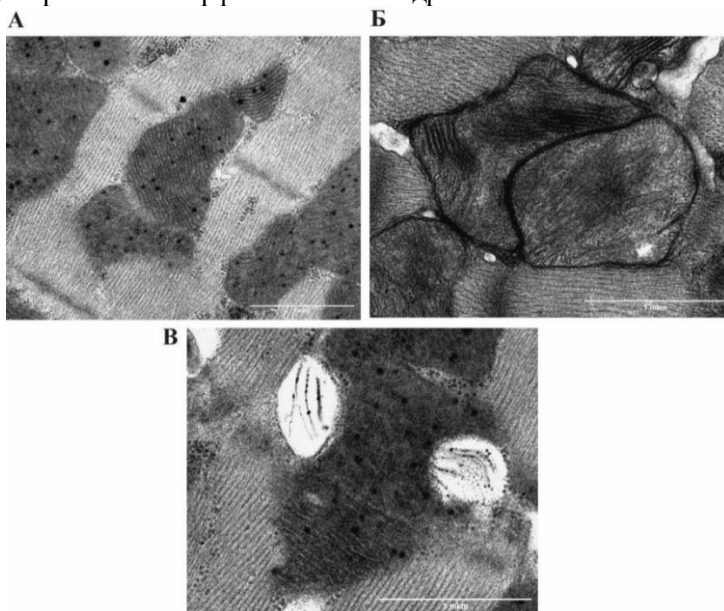


Рисунок 6 - Особенности ультраструктуры миокарда мышцы: более проницаемая для электронов оболочка митохондрий в клетках миокарда животных, получавших КК (А) в сравнении с контролем (Б), митофагия (В).

Таблица 5 – Особенности морфологии везикул (лизосомы, фагосомы) в тканях желудочков сердца мышей.

	Площадь, мкм <sup>2</sup>	Периметр, мкм
Контроль	0,045 ± 0,07	0,86 ± 0,43
Мыши, получавшие КК	0,123 ± 0,08	1,3 ± 0,45
p-значение	0,0000067	0,0000163

## ВЫВОДЫ

1. Оптимальный протокол получения КК из бактериальной культуры сверхпродуцента *E. coli* S17-3 pBhya-CAB должен включать культивирование при pH 4,5, инактивированию бактериальных клеток антибиотиками и их удаление центрифугированием, осаждение трихлорускусной кислотой и этанолом для очистки от примесей. Полученный выход по описанному протоколу составил 213,8 мг из 1 л культуры.

2. Добавление КК не приводит к снижению жизнеспособности в клеточных линиях Vero и HPF в диапазоне концентраций 1–256 мкг/мл, однако полисахарид проявляет слабую антипролиферативную активность в отношении клеточных линий опухолевого происхождения (IMR-32, НСТ-116) – жизнеспособность клеток снижается до 85 % при концентрации КК 256 мкг/мл. При культивировании с КК в концентрации 256 мкг/мл также наблюдается снижение жизнеспособности клеток линии миоцитов мышцы С2С12 до 70 %.

3. КК в концентрации 200 мкг/мл индуцирует морфологические изменения клеточной линии С2С12, характерные для миогенной дифференцировки клеток. Добавление КК в культуры клеток опухолевого происхождения (IMR-32, НСТ-116) не приводит к изменению морфологии клеток.

4. При концентрации КК 200 мкг/мл наблюдается увеличение клеточной гибели клеток линии С2С12 (увеличение содержания клеток, окрашенных PI, до 11,36 %) и увеличение мембранного потенциала митохондрий, что может отражать дифференцировку клеток данной клеточной линии. Также отмечается характерное для дифференцировки увеличение содержания АФК при использовании концентрации 50 мкг/мл до 77 %, однако фиксируется снижение содержания АФК до 62,3 % при

концентрации 200 мкг/мл, что может быть проявлением слабых антиоксидантных свойств КК.

5. При анализе субхронической токсичности не зафиксирована гибель животных, однако выявлены отдельные признаки токсичности, выражавшиеся в изменении состояния шерсти, массы тела и внутренних органов. Изменения являются дозозависимыми, что подтверждает безопасность использования невысоких концентраций КК (0,1–0,5 мг/г). КК также влияет на физическую активность животных, что подтверждается результатами теста вынужденного плавания. Было выявлено увеличение времени первого заплыва в первые 7 дней эксперимента до  $128,8 \pm 8,6$  с в сравнении с контролем  $110 \pm 10,9$  с, однако в дальнейшем длительность заплывов сокращалась.

6. КК индуцирует изменения в ультраструктуре миокарда желудочков сердца мышей, в том числе увеличение площади везикул до  $0,123 \pm 0,08$  мкм<sup>2</sup> в сравнении с контролем  $0,045 \pm 0,07$  мкм<sup>2</sup>, при этом отмечается появление признаков митофагии.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Научные статьи в журналах, рецензируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science:**

1. Tsvetikova S.A., Zabavkina A.A., Ivankova O.V., Koshel E.I. Cellular Effects of *Enterobacteriaceae* Polysaccharide Colanic Acid // International Journal of Molecular Sciences – 2024. Т. 25, No. 15, С. 8017;
2. Tsvetikova S.A., Zabavkina A.A., Nikonorova V.G., Tsymbal S.A., Dukhinova M.S., Chrishtop V.V., Koshel E.I. Stimulatory Effect on Mice by Bacterial Exopolysaccharide, Colanic Acid // Russian Journal of Bioorganic Chemistry - 2024, Т. 50, No. 2, С. 594–603;
3. Tsvetikova S.A., Koshel E.I. Optimized Protocol for Production and Extraction of Colanic Acid from *E. coli* Culture // Russian Journal of Bioorganic Chemistry - 2024, Т. 50, No. 4, С. 1357–1364;
4. Tsvetikova S., Koshel E.I. Microbiota and cancer: host cellular mechanisms activated by gut microbial metabolites // International Journal of Medical Microbiology - 2020, Т. 310, No. 4, С. 151425.

**Публикации в иных изданиях:**

1. Цветикова С.А., Забавкина А.А., Кошель Е.И. Исследование геропротекторных свойств колановой кислоты – экзополисахарида бактерий *Enterobacteriaceae*/VIII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019» - 2019. - С. 205

2. Торопко М.С., Шуб А.И., Цветикова С.А., Кошель Е.И. конструирование делеционного мутанта *E. coli* Nissle 1917 – сверхпродуцента колановой кислоты//VIII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019» - 2019.
3. Цветикова С.А., Забавкина А.А., Кошель Е.И. Экзополисахарид бактерий *Enterobacteriaceae* стимулирует метаболизм млекопитающих//Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020» - 2020
4. Цветикова С.А., Забавкина А.А., Никонорова В.Г., Криштоп В.В., Кошель Е.И. Исследование влияния бактериального экзополисахарида колановой кислоты на организм млекопитающих//VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов - 2020. - С. 170-171
5. Шитова А.С., Цветикова С.А., Кошель Е.И. Поиск кластера генов *wca* среди штаммов *Escherichia coli*//Сборник материалов Форума «Ломоносов-2021» - 2021
6. Забавкина А.А., Цветикова С.А., Криштоп В.В., Кошель Е.И. Биологическая активность бактериальных экзополисахаридов//Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. Электронное издание. – 2021

## **БЛАГОДАРНОСТЬ**

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю Кошель Е.И. за помощь в организации и планировании исследования, наставничество во время обучения в магистратуре и аспирантуре и поддержку при подготовке к защите диссертации.

Автор благодарит сотрудников Химико-биологического кластера и соавторов статей за участие в проведении экспериментов и интерпретации результатов. Особую благодарность автор выражает Забавкиной А.А. за плодотворное сотрудничество в проведении исследований и Гандалипову Э.Р. за участие в постановке экспериментов на клеточных линиях и обсуждении полученных данных.

Также автор благодарит коллег из других организаций и институтов, помогавших получить представленные в работе данные – Никонорову В.Г. и Криштопа В.В. (исследование на животных), Сенченкову С.Н. (анализ моносахаридного состава образцов КК), Брагину Е.Ю. (получение снимков ПЭМ миокарда мыши).