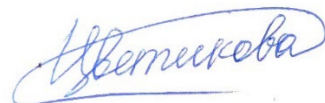


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский университет ИТМО»
(Университет ИТМО)

На правах рукописи



Цветикова Софья Андреевна

**Исследование биологических свойств бактериального экзополисахарида
колановой кислоты
1.5.4 – Биохимия**

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Кошель Елена Ивановна

Санкт-Петербург – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Бактериальные полисахариды.....	14
1.1.1. Бактериальные полисахариды в регуляции иммунитета и воспаления	14
1.1.2. Влияние бактериальных полисахаридов на функционирование митохондрий и окислительный стресс	15
1.1.3. Антипролиферативные свойства полисахаридов	17
1.2. КК как бактериальный экзополисахарид.....	20
1.2.1. История изучения и описания структуры КК	20
1.2.2. Регуляция биосинтеза КК.....	25
1.2.3. Роль КК в физиологии адаптации бактерий.....	27
1.2.4. Биологическая активность КК в исследованиях на многоклеточных организмах	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1. Получение КК из бактериальной культуры	32
2.1.1. Условия культивирования.....	32
2.1.2. Протокол выделения и очистки КК	33
2.1.3. Описание образцов КК.....	36
2.2. Исследование влияния КК на клеточные линии млекопитающих (<i>in vitro</i>). 36	
2.2.1. Клеточные линии	36
2.2.2. Оценка жизнеспособности клеточных линий в присутствии КК.....	37
2.2.3. Оценка влияния КК на морфологию клеток	38
2.2.4. Проточная цитометрия для оценки кинетики гибели клеток миоцитов. 39	

2.2.5. Оценка влияния КК на мембранный потенциал митохондрий и формирование АФК в клетках миоцитов	39
2.3. Исследование эффектов КК на мышцах (<i>in vivo</i>)	41
2.3.1. Анализ субхронической токсичности КК	41
2.3.2. Оценка влияния КК на физическую активность животных в тесте вынужденного плавания.....	42
2.3.3. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) желудочков сердца мыши	44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	45
3.1. Оптимизация протокола выделения КК	45
3.1.1. Анализ образцов КК, полученных при использовании разных протоколов культивирования и выделения.....	45
3.1.2. Анализ полученных образцов методом ГХ-МС	47
3.1.3. Выводы о применении протоколов выделения и очистки для получения КК	50
3.2. Исследование биологических эффектов КК <i>in vitro</i>	51
3.2.1. Оценка жизнеспособности клеточных линий в присутствии КК.....	51
3.2.2. Анализ влияния КК на морфологию клеток	53
3.2.3. Анализ влияния КК на клеточную гибель в линии миоцитов	56
3.2.4. Анализ количества активных митохондрий и формирования АФК в клеточной линии миоцитов в присутствии КК.....	58
3.2.5. Вывод по анализу эффектов КК <i>in vitro</i>	62
3.3. Исследование влияния КК на организм мышей	63
3.3.1. Оценка субхронической токсичности КК	63
3.3.2. Изменение массы внутренних органов мышей при получении КК	69
3.3.3. Оценка влияния КК на физическую активность мышей	74

3.3.4. Влияние КК на ультраструктуру миокарда желудочков сердца мыши ..	77
3.3.5. Выводы о влиянии КК на организм мышей.....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
ВЫВОДЫ	86
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	88
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	89

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Бактериальные метаболиты являются источником новых потенциальных препаратов и пищевых добавок [1,2]. Среди метаболитов особый интерес вызывают бактериальные полисахариды [3], обладающие широким спектром действия – помимо структурной и защитной функции для бактерий, они могут обладать антипролиферативными [4], антиоксидантными [5] и иммуномодуляторными [6] свойствами. При этом полисахариды обладают высокой биосовместимостью и являются гидрофильными, что создает широкий потенциал применения в биомедицине [7]. Однако сложность и разнообразие структуры полисахаридов, многоэтапность биологического и химического синтеза и многокомпонентная регуляция экспрессии ограничивают их применение и становятся препятствием в изучении.

Большинство бактериальных полисахаридов входят в состав их оболочки (липополисахариды (ЛПС), капсульные полисахариды) и их окружения, либо матрикса биопленок (экзополисахариды, ЭПС). Биологические свойства полисахаридов зависят от их моносахаридного состава, наличия дополнительных групп, разветвленности и молекулярного веса [7]. 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 анализа полисахаридов в связи с их влиянием на патогенные свойства бактерий, исследование бактериальных полисахаридов и их влияния на организм человека проводится в трех направлениях. Первое – поиск бактериальных полисахаридов, обладающих антипролиферативной активностью. Широкое разнообразие структур и высокая биосовместимость полисахаридов формирует возможность их применения в биомедицине, в том числе в разработке противоопухолевых препаратов [8]. Другим направлением является исследование продукции бактериальных полисахаридов кишечной микробиотой и иммуномодуляции. Примером такого полисахарида является полисахарид А, продуцируемый *Bacteroides fragilis* [9]. Третьим направлением является использование

полисахаридов в качестве матрикса для разработки ранозаживляющих повязок и 3D печати биосовместимых структур, для чего часто используется бактериальная целлюлоза [10].

Одним из полисахаридов, привлекших значительное внимание исследователей в последние годы, является колановая кислота (КК). Хотя полисахарид впервые был описан в 1963 году [11], он долгое время считался одним из структурных компонентов бактериальных биопленок и капсул, но в 2017 году были описаны его свойства в модели нематод и дрозофил [12]. Исследования [12,13] указывают, 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 [14,15] и демонстрировали ее иммуногенную активность в инъекциях, но эффекты от перорального введения ранее описаны не были.

Кроме того, КК является важным компонентом бактериальных биопленок [16], играющих значительную роль в инфекционных [17,18] и неинфекционных заболеваниях [19]. Изучение ее влияния на клетки млекопитающих может помочь лучше понять механизмы этого взаимодействия.

Для оценки потенциала применения КК как биоактивного вещества и потенциального геропротектора 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 получении животными поможет оценить ее потенциал в биомедицине и безопасность применения.

Степень разработанности темы исследования

Впервые КК была описана доктором В. Ф. Гебелем в 1963 году [11], указавшем на ее ассоциацию с мукоидным фенотипом штаммов *E. coli*. В дальнейшем КК

рассматривалась как структурный полисахарид, входящий в состав капсул [20] и матрикса биопленок [16]. В недавнем исследовании [12] 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 [13] те же авторы разработали штамм *Escherichia coli*, синтез КК в котором контролируется оптогенетически. Уровень экспрессии КК влиял на увеличение продолжительности жизни нематод, а также на фрагментацию митохондрий [12].

Несмотря на интригующие свойства полисахарида КК, выявленные при воздействии на беспозвоночных, более детального описания эффектов на клеточных линиях или исследования на других моделях животных не проводилось. Существует только единичное упоминание о возможном синтезе КК микробиотой млекопитающих [21], которому противоречат данные об индукции синтеза КК при снижении температуры окружающей среды до 19 °С [22]. Кроме того, не проводилось работ по оценке влияния КК на организм млекопитающих при пероральном введении, оценивались только свойства при внутривенных и внутрибрюшинных инъекциях [11,14]. Для дальнейшего изучения биологических свойств КК в организме млекопитающих необходимо проведение исследований токсичности и анализ эффектов КК в *in vitro* и *in vivo* моделях.

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 мышах. 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 С2С12.

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 (НСТ-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 мышах 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 – материалы всероссийских и международных научных конференций.

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.

Материалы диссертационного исследования были представлены на конференциях с публикацией тезисов:

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

Публикации

По теме диссертации подготовлено 4 научные статьи:

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, Vol. 25, No. 15, pp. 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, Vol. 50, No. 2, pp. 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, Vol. 50, No. 4, pp. 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, Vol. 310, No. 4, pp. 151425.

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 выполнялся автором. Анализ образцов КК проводили 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 Российской Академии Наук) под руководством Сенченковой С.Н. Исследования на модели мышей проводились 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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Бактериальные полисахариды

1.1.1. Бактериальные полисахариды в регуляции иммунитета и воспаления

Большинство бактериальных полисахаридов, входящих в состав оболочки (ЛПС, ЭПС), относятся к патоген-ассоциированным молекулярным паттернам (ПАМП), которые распознаются специализированными рецепторами иммунных клеток (pattern recognition receptor, PRR) [23]. Хотя рецепторы, распознающие именно КК, на сегодняшний день не известны, потенциально ее способны распознать маннозный рецептор (MR, CD206) и Толл-подобные рецепторы (Toll-like Receptors, TLRs).

Маннозные рецепторы могут располагаться на мембране макрофагов и содержать несколько доменов распознавания углеводов, при этом связывание углеводов является Ca^{2+} -зависимым, так как рецептор содержит 8 лектиновых доменов С типа (C-type lectin domains, CTLDs) [24]. Помимо макрофагов, данный рецептор встречается и у клеток различного происхождения: синусоидальные эндотелиальные клетки печени, астроциты, микроглия, незрелые дендритные клетки, некоторые клетки кожи [24]. Рецептор обладает также растворимой формой, представленной в просвете кишечника и сыворотке крови [24,25].

Активация рецептора как правило ассоциирована с острым и хроническим воспалением, в том числе, вызванном бактериальными инфекциями [26,27]. Рецепторы способны распознавать ЭПС, ЛПС и капсульные полисахариды [28]. Наибольшей аффинностью к этому рецептору обладает D-манноза, далее по убыванию – L-фукоза, D-глюкоза, D-галактоза [29]. Эти моносахариды входят в состав мономера КК [30], что позволяет предположить возможность распознавания им полисахарида КК, что, однако, не было проверено экспериментально.

К Толл-подобным рецепторам, известным способностью распознавать бактериальные полисахариды, относятся TLR4 [31] и TLR2 [32]. Среди лигандов TLR4 наиболее представлены кислые полисахариды, состоящие из остатков

глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы и арабинозы [31]. Через эти рецепторы полисахариды бактерий распознаются дендритными клетками, макрофагами и Т-хелперными лимфоцитами (Th1, Th2), что приводит к NF-κB-опосредованной регуляции экспрессии генов, ассоциированной с активацией воспалительного ответа [32].

Одним из наиболее охарактеризованных полисахаридов, связывающихся с TLR2, является полисахарид А (polysaccharide А, PSA) грамотрицательной бактерии *Bacteroides fragilis*. PSA синтезируется бактериями кишечной микробиоты и ассоциирован со снижением риска развития воспалительных и аутоиммунных заболеваний, что происходит за счет связывания с рецептором и регуляции баланса Т-хелперных клеток [9]. Другим механизмом снижения уровня воспаления является способность бактериальных полисахаридов связывать ионы кальция, что снижает скорость реакций в кальций-зависимых каскадах [33].

Цвиттерионные капсульные полисахариды, которые часто синтезируются кишечной микробиотой, могут обладать противовоспалительным эффектом и индуцировать синтез IL-10 Т-регуляторными клетками [34,35]. Полисахариды активируют адаптивный иммунитет хозяина через антигенпрезентирующие клетки, после чего следует презентация этих полисахаридов с использованием II класса главного комплекса гистосовместимости CD4(+) Т-клеткам [36].

Влияние бактериальных полисахаридов на регуляцию воспаления часто ассоциировано с нарушением регуляции процесса окисления в митохондриях и увеличения концентрации АФК в цитоплазме и за пределами иммунных клеток. Например, при эндотоксемии ЛПС могут стимулировать провоспалительную активность нейтрофилов и микроглии, при этом повышается уровень АФК [37,38].

1.1.2. Влияние бактериальных полисахаридов на функционирование митохондрий и окислительный стресс

Побочным продуктом функционирования митохондрий и процесса окислительного фосфорилирования являются активные формы кислорода (АФК). Обычно они связываются антиоксидантными системами клетки, которые

защищают ее от воздействия АФК, в том числе от повреждения липидов и ДНК. Резкое увеличение концентрации АФК в сочетании со сниженным антиоксидантным потенциалом клетки может приводить к индукции различного рода стресс-ответа, в том числе к программируемой клеточной гибели [39]. Обычно это сопровождается нарушением функционирования и целостности митохондрий, выходом цитохрома с и последующей активацией каспазы-9 [40].

Некоторые бактериальные ЭПС могут играть роль антиоксидантов [41,42]. Например, бактериальный полисахарид с высоким содержанием фукозы, полученный из *Bacillus megaterium* RB-05, защищает клетки WI38 (фибробласты легких эмбриона человека) от индуцированного перекисью водорода оксидативного стресса, препятствуя клеточной гибели [41] (таблица 2). Это происходит за счет связывания АФК, что позволяет поддерживать мембранный потенциал митохондрий и экспрессию белков семейства Bcl-2. Поддержание внутриклеточного гомеостаза стабилизирует регуляторную систему Nrf2/Keap1 [43].

Аналогичный полисахарид из того же продуцента, но с низким содержанием фукозы, обладает противоположной способностью увеличивать уровень АФК и проницаемость мембраны митохондрий, что приводит к активации апоптоза [44] (таблица 2). Это различие связано со способностью полисахаридов связывать АФК, препятствуя их реакции с мишенями в клетке. Особенно эта функция выражена у полисахаридов с высоким содержанием фукозы, к которым можно отнести и КК.

Другим примером бактериального полисахарида с антиоксидантными свойствами является ЭПС *Streptomyces virginia* H03 [45]. Кроме того, полисахарид является термостабильным – его антиоксидантные свойства практически не изменяются после нагревания от 50 до 100°C в течение 5 минут, тогда как антиоксидантные свойства аскорбиновой кислоты при нагревании резко снижаются. Также к ЭПС, антиоксидантные свойства которых сравнимы с аскорбиновой кислотой, можно отнести полисахарид *Aerococcus uriaeequi*, особенно активный против гидроксильного радикала [46], полисахариды некоторых *Enterobacteriaceae* [47], и полисахарид из *Bacillus amyloliquefaciens* [48].

Обнаружено, что влияние КК на продолжительность жизни нематод ассоциировано с ее влиянием на митохондрии [12]. Авторы выделяют несколько ключевых аспектов влияния КК:

- 1) Регуляция динамики митохондрий. Мутантные штаммы, избыточно продуцирующие КК, снижают фрагментацию митохондрий в мышечных тканях нематод, характерную для старения. Кроме того, подобный эффект был продемонстрирован и на клеточной линии млекопитающих (NIH/3T3, стабильно экспрессирующих dsRed2-mito)
- 2) Митохондриальный ответ на несвернутые белки (UPRmt). При стрессе добавление КК приводит к индукции HSP-6 и индукции UPRmt. В то же время, мутация нематод по гену *atfs-1(gk3094)* (кодирует ATFS-1, транскрипционный фактор регуляции UPRmt) полностью подавляет влияние КК на продолжительность жизни.

При этом КК не влияет на уровень митохондриальной ДНК, продукцию АТФ или накопление липидов, а также не проявляет эффекта на линиях нематод, имеющих мутации в генах, связанных с функционированием электрон-транспортной цепи (*nuc-6(qm200)* и *isp-1(qm150)*) [12]. Важно отметить, что эти эффекты наблюдались и у эволюционно далеких от *C. elegans* беспозвоночных - *Panagrellus redivivus*, *C. briggsae*, *Drosophila melanogaster*, что позволяет предположить универсальность действия КК в различных таксонах многоклеточных организмов [12].

1.1.3. Антипролиферативные свойства полисахаридов

Для многих полисахаридов описана способность снижать пролиферацию клеточных линий опухолевого происхождения. Влияние бактериальных полисахаридов на клеточный цикл может быть реализовано через взаимодействие с белками, регулируемыми процессы распознавания, адгезии, межклеточных взаимодействий и путем прямого взаимодействия с рецепторами. При этом возможен запуск ряда внутриклеточных реакций, таких как деполяризация мембраны митохондрий и запуск апоптоза по митохондриальному пути,

нарушение антиоксидантной системы и нарушение проницаемости клеточной мембраны. На уровне организма полисахариды могут обладать иммуномодулирующим действием путем активации экспрессии цитокинов и синтеза NO [4]. Примеры бактериальных полисахаридов, обладающих антипролиферативной активностью, представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Бактериальные полисахариды, обладающие антипролиферативной активностью

Полисахарид	Особенности структуры	Антипролиферативная активность	Источник
Капсульный полисахарид из <i>Kangiella japonica</i> КММ 3879	Неразветвленный, сульфатированный. Мономер состоит из двух остатков 2-ацетамидо-2-деокси-D-глюкозы и одного остатка 2-амино-2-деокси-D-маннуриновой кислоты	Клеточная линия Т47D (рак молочной железы, протоковая карцинома) – индукция остановки клеточного цикла в контрольной точке G0/G1. Активация сигнальных путей ERK1/2, p38, митохондриального пути апоптоза	[49]
Капсульный полисахарид из <i>Psychrobacter marincola</i> КММ 277 ^T	Разветвленный. Мономер состоит из двух остатков 2-N-ацетил-2-деокси-D-галактуроновой кислоты, один остаток 2-N-ацетил-2-деокси-d-	Клеточная линия HL-60 (острая промиелоцитарная лейкемия человека). Также клеточные линии: Raji (мужские лимфобластоподобные	[50]

	<p>глюкозы, один d-глюкозы, d-рибозы, и 7-N-ацетиламино-3,5,7,9-тетрадеокси-5-N-[(R)-2-гидроксипропаноиламино]-1-глицеро-1-манно-нон-2-улосоновой кислоты</p>	<p>клетки из лимфомы Беркитта), НТ-29 (колоректальная карцинома), ТНР-1 (острый миелоидный лейкоз)</p>	
<p>ЭПС <i>Bacillus thuringiensis</i> RSK CAS4</p>	<p>Преобладают остатки фруктозы и галактозы</p>	<p>Клеточные линии НErG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), A549 (аденокарцинома легкого), Vero (почка африканской зеленой мартышки)</p>	[42]
<p>Капсульный полисахарид из <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> Sq02</p>	<p>Сформирован N-ацетилированными аминасахарами</p>	<p>Клеточные линии Сасо-2 и НСТ-116 (колоректальный рак). При добавлении полисахарида активируются каспазы 3 и 9</p>	[51]
<p>Полисахарид из <i>Bacillus megaterium</i> RB-05</p>	<p>Низкое содержание фукозы</p>	<p>Клеточная линия A549 (аденокарцинома легкого) – активация митохондриального пути апоптоза. При</p>	[44]

		ЭТОМ ПОВЫШАЕТСЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИИ, УВЕЛИЧИВАЕТСЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ АФК, ПРОИСХОДИТ АКТИВАЦИЯ КАСПАЗ И ПУТИ Nrf2/Keap1, ОПОСРЕДОВАННОГО МАРК	
--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Хотя антипролиферативная активность КК ранее не оценивалась, данных о ее цитотоксичности в литературе также не представлено. Однако описано [12], что КК может сокращать формирование герминогенных опухолей и увеличивать продолжительность жизни нематод линии *C. elegans glp-1(ar202)*.

1.2. КК как бактериальный экзополисахарид

1.2.1. История изучения и описания структуры КК

КК была обнаружена доктором В. Ф. Гебелем в 1963 году [11]. Во время изучения колицина К он обнаружил новый фенотип колоний с повышенным слизиобразованием. Он обнаружил, что этот фенотип связан с избыточной продукцией разветвлённого кислого гетерополисахарида, названного им колановой кислотой (КК). В. Ф. Гебель разработал первый протокол выделения КК из штамма *Escherichia coli* K235 с выходом 0,7 г полисахарида из 15 л бактериальной культуры. Образец КК был описан как очищенный от белков, липидов, нуклеиновых кислот и компонентов среды. Дополнительно образец был очищен от О-антигена и коланоминовой кислоты.

В более позднем исследовании [15] авторы использовали менее сложный протокол с меньшим количеством этапов осаждения и очистки, что привело к получению выхода 0,7 г из 1 л культуры штамма *E. coli* K-12. Авторы описывают высушенный полисахарид как белое нитчатое вещество, при растворении в воде формирующий очень вязкий раствор. Также было выявлено, что КК содержит глюкозу, галактозу, фукозу и глюкуроновую кислоту [11].

В дальнейших исследованиях было выявлено, что КК также содержит остатки ацетата и пирувата, при этом компоненты (моносахариды и кислоты) содержатся в соотношении 1:1,8:1,9:1:1:1 [11,30,52]. Выявленная структура КК представлена на рисунке 1. Оказалось, что установить молекулярную массу полисахарида сложно, так как она может значительно варьироваться [53,54] и достигать более 1 млн Да [53].

В дальнейших исследованиях были также проведены исследования структуры КК методами ИК-спектromетрии и газовой хроматографии-масс-спектromетрии (ГХ-МС) (рисунок 2, 3) [22,30].

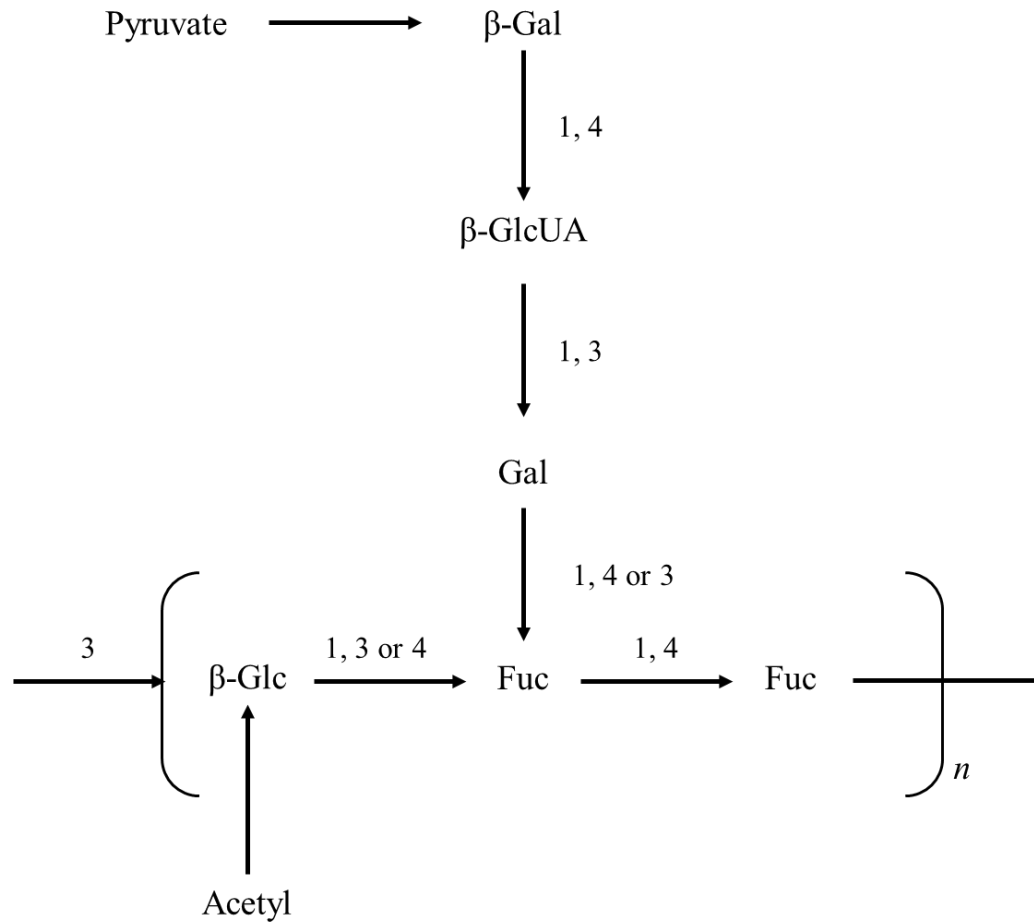


Рисунок 1 – Структура мономера КК [30]. КК – разветвленный гетерополисахарид с высокой молекулярной массой, содержащий галактозу (Gal), β -глюкуроновую кислоту (β -GlcUA), глюкозу (Glc), фукозу (Fuc) и остатки ацетата и пирувата.

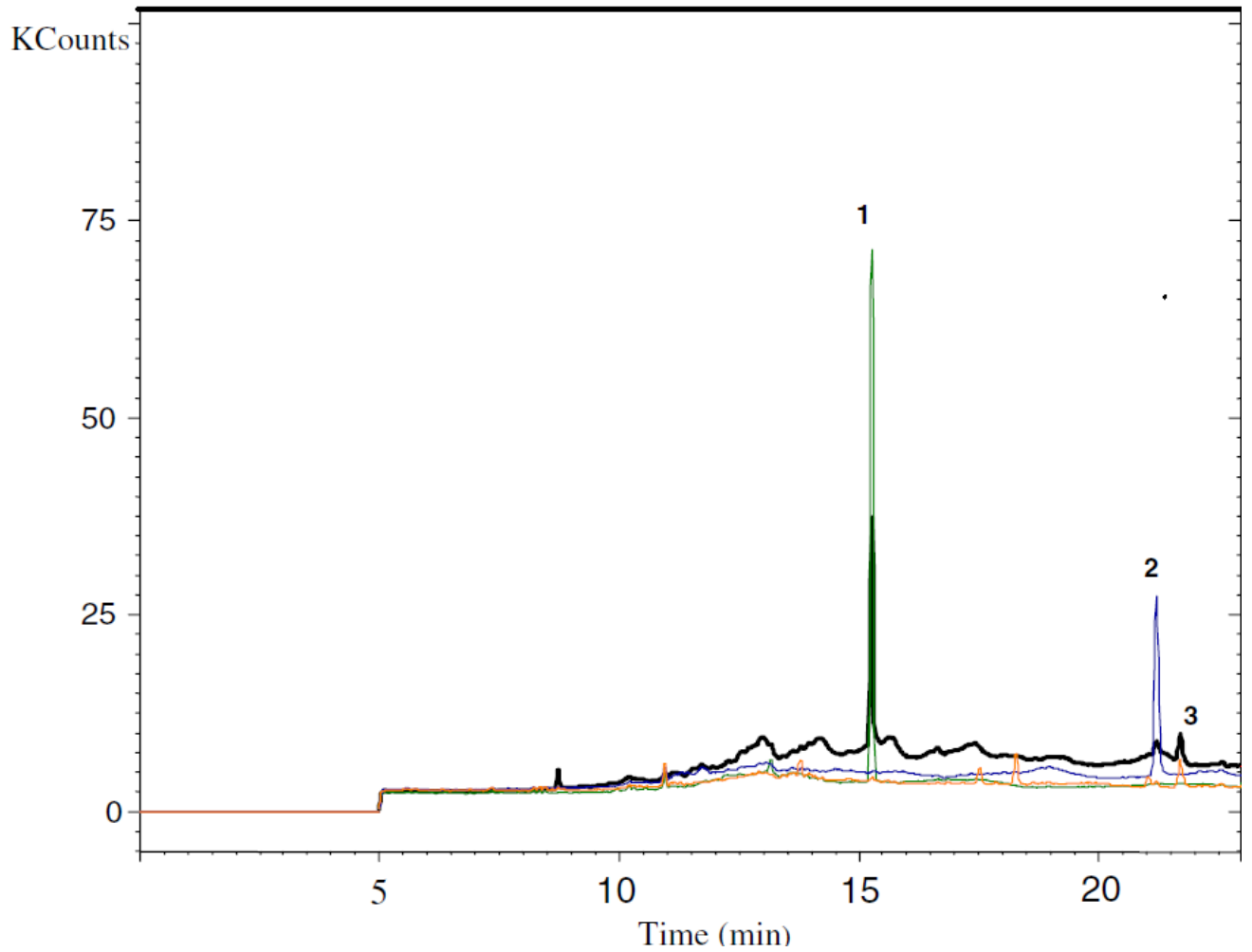


Рисунок 2 – ГХ-МС спектр КК, полученной из культуры *E. coli* K92 (черная линия).
Стандарты: фукоза (зеленый, 1), глюкоза (синий, 2), галактоза (оранжевый, 3) [22]

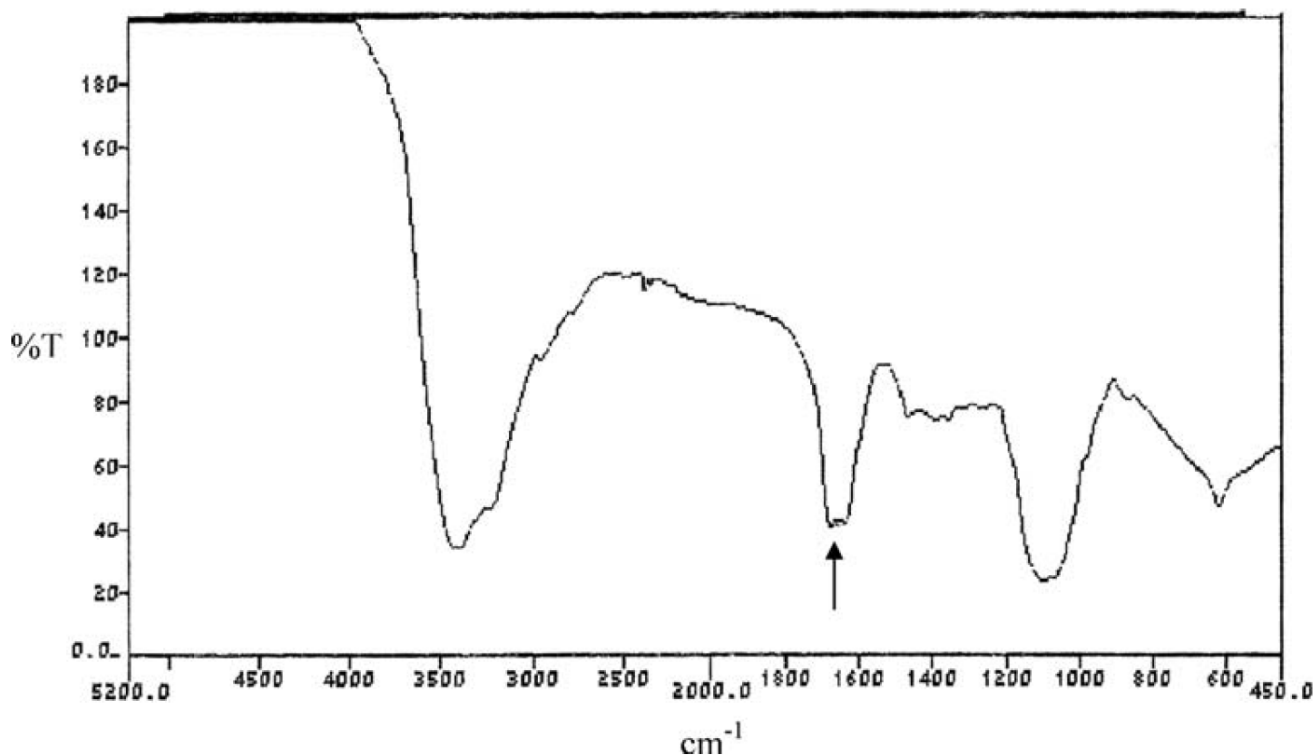


Рисунок 3 – Анализ ИК-спектра КК, полученной из *E. coli* K92. Стрелка указывает на наличие карбонильной группы [22]

Наибольший описанный выход КК при выделении из бактериальной культуры описан в работах [54,55] и составляет 25 и 49,9 г на 1 л культуры. Такое количество КК синтезируют штаммы *E. coli* с нарушенной регуляцией синтеза КК, что приводит к ее активному синтезу, однако при этом формируются короткие цепи. Формирование большого объема КК при сохранении длины цепи описано в работе [53] – 10,39 г из 1 л культуры *E. coli* S17-3 pBhyaCAB. Этот штамм был создан на основе родительского штамма *E. coli* S17-3 (получен из *E. coli* S17-1) с использованием плазмиды pBhyaCAB (pBluescript (+) II SK со вставленными генами полигидроксибутират-синтазы и промотором гидрогеназы I). Авторы предполагают, что высокий выход КК связан с повышением продукции интермедиатов, общих для синтеза полигидроксибутирата и КК (ацетил-КоА, ацетилфосфат). Однако в протоколе выделения КК отсутствуют этапы диализа и присутствует этап кипячения бактериальной культуры, что может привести к присутствию в образце белков, липидов, нуклеиновых кислот [14], коломиновой кислоты и O-антигена.

1.2.2. Регуляция биосинтеза КК

Первоначально КК была описана только для кишечной палочки [11,15]. Однако в дальнейшем было выяснено, что КК встречается и у других представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter cloacaceae*, *Salmonella* sp.) [56,57]. Отдельные работы указывают, что КК может синтезироваться и *Klebsiella* sp., однако анализ продуктов метанолиза показал [58,59], что описанное вещество может быть другим полисахаридом [52]. Бактерии, не входящие в семейство *Enterobacteriaceae*, также синтезируют КК, например, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Erwinia stewartia* [60], *Pectobacterium carotovorum* [61], *Vibrio* sp. [62].

Ферменты, участвующие в синтезе КК, кодируются в кластере *wca* (ранее – *cps*), состоящим из двадцати генов [63,64] (рисунок 4). Процесс синтеза КК показан на рисунке 5 [65]. Пять ферментов участвуют в синтезе предшественников КК (CpsB (ManC), CpsG (ManB), Gmd, WcaG, и WcaH), другие необходимы для сборки и транслокации КК (WcaJ, I, E, C, A, L) [66]. Два фермента, WcaL и WcaK, участвуют в присоединении КК к липидному кору [67] – такая форма КК называется М-антиген [56].



Рисунок 4 – Строение кластера *wca*, кодирующего ферменты, участвующие в процессе синтеза КК. В некоторых исследованиях *manB* и *manC* называют *cpsB* и *cpsG* [65]

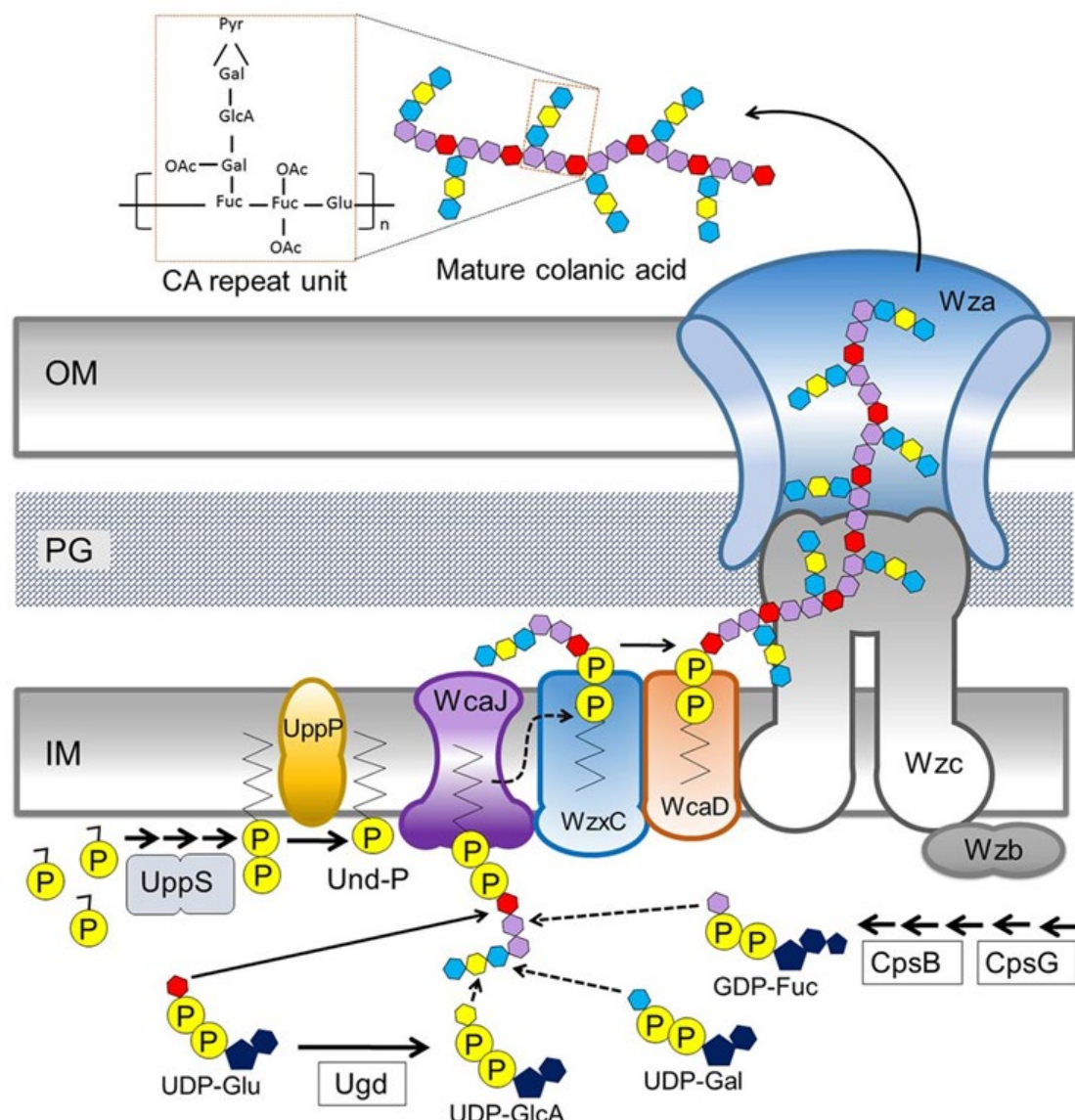


Рисунок 5 – Схема синтеза КК с указанием основных ферментов [65]. IM – внутренняя мембрана, PG – пептидогликан, OM – внешняя мембрана

Регуляция синтеза КК реализуется через сложную систему ферментов:

1) Регуляторная система по принципу фосфореле Rcs (regulation of capsular synthesis) – наиболее изученная система [68].

Rcs ответ инициируется сенсором RcsC через аутофосфорилирование киназы [69]. Белок RcsD (также называемый YojN) переносит фосфат на RcsB [70,71]. Белок RcsB активирует транскрипцию вспомогательного регулятора RcsA [72], после чего гетеродимер RcsBA индуцирует экспрессию кластера генов

wca, включающего гены, кодирующие все основные ферменты синтеза КК [73].

2) Негативная регуляция (протеаза Lon, глобальный регулятор H-NS).

Протеаза Lon разрушает нестабильный белок RcsA, предотвращая сборку гетеродимера RcsBA и экспрессию кластера *wca* [60,72,74]. Другой негативный регулятор, H-NS (histone-like nucleoid-structuring protein) репрессирует экспрессию генов путем компактизации нуклеоида – в том числе, снижая экспрессию гена RcsA [75]. Мутантные штаммы *E. coli* Δlon и Δhns синтезируют повышенное количество КК, что подтверждает их роль негативных регуляторов [12].

3) Регуляция через чувство кворума.

Во время фазы адгезии при формировании биопленки *E. coli* синтезирует сигнальную молекулу аутоиндуктора-2 (autoinducer-2), снижающую синтез КК через снижение синтеза периплазматического белка YbiM (McbA) и транскрипционный фактор YncC [76].

4) Комплекс DnaK-DjlA.

DjlA является мембранным белком и ко-шапероном DnaK. Совместно их комплекс является негативным регулятором экспрессии белков Rcs и, соответственно, синтеза КК [77,78].

5) Rcs-зависимая избыточная экспрессия липопротеина *ypdI* ассоциирована с повышенным синтезом КК [79].

6) Антитерминатор транскрипции RfaH поддерживает транскрипцию больших кластеров генов, таких как *wca*. Он поддерживает синтез полисиаловой кислоты и КК [80].

1.2.3. Роль КК в физиологии адаптации бактерий

Существует четыре типа капсул *E. coli* (таблица 2, [81,82]), различающихся по составу полисахаридов. КК синтезируется совместно с ЛПС в типах 2, 3 [83], 4 [84]. Капсулы 4 группы представлены у патогенных штаммов *E. coli*, вызывающих

кишечные инфекции, в то время как капсулы 2 и 3 группы встречаются в изолятах, вызывающих внекишечные инфекции [85].

Таблица 2 – Типы капсул *E. coli* с указанием наличия КК в них [81,82]

Параметры	Группы капсул			
	1	2	3	4
ЛПС (бывшие К-антигены)	Подтип IA	Подтип II	Подтипы I/II или III	Подтип IV (капсулы с O-антигеном)
Коэкспрессия с серогруппами O-антигена	Ограниченно (O8, O9, O20, O101)	Большинство серогрупп	Большинство серогрупп	Часто O8, O9, но иногда без O-антигена
Коэкспрессия с КК	Нет	Да	Да	Да
Терморегулируемая экспрессия (не синтезируются при температуре ниже 20 °C)	Нет	Да	Нет	Нет
Позитивная регуляция системой Rcs	Да	Нет	Нет	Нет

В основном КК синтезируется как ЭПС и играет роль в формировании оболочки бактериальной клетки и в формировании матрикса биопленки [86]. Как компонент оболочки бактериальной клетки КК защищает ее от неблагоприятных условий [87]. Например, у штамма *E. coli* $\Delta waaF$ нарушен синтез кора ЛПС, но это компенсируется избыточным синтезом КК [63].

Кроме того, продукция КК может быть индуцирована низкими температурами [22], осмотическим шоком [75] (в том числе, вызванном высокой концентрацией цинка [88]), ростом в гипотонической среде [89], высыханием [60], присутствием детергентов [90]. В этих условиях *E. coli* может синтезировать два типа капсульных полисахаридов – полисиаловые кислоты и КК. Капсула, сформированная КК, более плотная. В штамме *E. coli* K92 капсула из полисиаловых кислот формируется в основном при 37 °С, в то время как наибольшая продукция КК происходит при 19 °С [22]. Эти примеры показывают роль КК как защитного ЭПС.

При формировании биопленки повышается продукция КК, образующей матрикс биопленки [91]. Во время развития биопленки электростатические силы отталкивания между оболочкой бактерии и поверхностью, поскольку обладают отрицательным зарядом [20]. Компоненты матрикса биопленки (белки, полисахариды, фимбрии, жгутики) помогают преодолеть эти силы [92,93]. Например, белок курлин может соединять поверхности оболочки бактерии и места прикрепления, в то время как жгутики необходимы на этапе первичного закрепления бактерий [16].

КК не является необходимым компонентом для инициации формирования биопленки, однако необходима для развития архитектуры объемных биопленок [16,17]. Синтез КК подавляется во время стадии адгезии транскрипционным фактором *YncS* под действием сигналов чувства кворума [76]. В то же время, синтез КК может быть и преимуществом на стадии прикрепления, что зависит от свойств поверхности и типа окружающей жидкости [94,95]. Штаммы, не способные синтезировать КК, по-прежнему способны формировать биопленки, однако они более тонкие и менее структурированные [86].

В целом КК играет защитную роль как компонент оболочки бактерий и структурную – как компонент матрикса биопленки. Как часть капсулы, КК защищает клетку от неблагоприятных условий внешней среды и частично от бактериофагов (однако может ими расщепляться [61,96]). КК не является обязательным компонентом матрикса биопленки, однако ее наличие помогает

поддержку архитектуру крупных биопленок и усилить прикрепление к некоторым типам поверхностей.

1.2.4 Биологическая активность КК в исследованиях на многоклеточных организмах

Впервые влияние КК на животных было оценено в работе В.Ф. Гебеля [11]. Мыши получали КК в виде раствора в концентрации 0,5, 1, 2 и 4 мг, введенного внутривентриально. Инъекция не привела к гибели животных, но симптомы совпадали с инъекцией небольшого количества эндотоксина – нарушение координации движений, диарея, снижение массы тела в течение 48 часов. Также было описано, что КК в серологическом анализе вызывает реакцию агглютинации с сывороткой кролика (анти-*E. coli* K235) и обладает собственной иммуногенной активностью [15].

КК трудно отделяется от ДНК и считается одним из нежелательных компонентов при разработке препаратов генной терапии [14]. Влияние КК на побочные эффекты терапии исследовали на мышах с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (*severe combined immunodeficiency (SCID)*). Образцы ДНК, содержащие КК, помещали в липосомы и другие катионные носители, после чего препарат инъецировали в хвостовую вену мышей. Мыши с SCID были более чувствительны к присутствию КК в образце, причем некоторые комбинации приводили к гибели животных. Мыши из контрольной группы (без SCID) были менее чувствительными к КК, однако высокие концентрации КК в препарате также приводили к гибели животных.

Эти исследования напрямую указывают на токсичность и иммуногенность КК при внутривенных и внутривентриальных инъекциях, однако не предоставляют данных о подобных эффектах при использовании очищенного препарата КК, а также препарата без дополнительных компонентов в виде ДНК и носителей.

Влияние КК было также изучено на других животных моделях [12]. В крупнейшем исследовании влияния выбора штамма бактерий для выращивания нематод (*Caenorhabditis elegans*) было проверено 3983 делеционных штамма *E. coli*

K12 из коллекции Кейо (Keio) [97], и при выращивании на 68 из штаммов наблюдали увеличение продолжительности жизни нематод. Кроме того, 13 штаммов были ассоциированы с уменьшением накопления возрастных изменений отдельных линий червей (накопление β -амилоида, формирование опухолей). Увеличение продолжительности жизни было связано с индукцией сигнальных путей IGF-1 и mTOR в случае двух штаммов, обладающих повышенным объемом синтеза КК – *E. coli* K-12 *Δhns* и *E. coli* K-12 *Δlon* (делеции по основным негативным регуляторам синтеза КК). Дальнейшее исследование также показало, что КК влияет на динамику деления митохондрий в эпителии кишечника нематод и клеточных линиях NIH/3T3 и регуляцию UPR в модели нематод. Оба параметра используются в качестве биомаркеров старения [98,99]. Увеличение продолжительности жизни наблюдали и при исследовании других нематод (*C. briggsae*, *Panagrellus redivivus*) и дрозофилы *Drosophila melanogaster* [12].

Эти данные показывают биологическую активность КК, ее влияние на продолжительность жизни беспозвоночных и маркеры старения. Поиск соединений, влияющих на продолжительность жизни – динамичное направление биомедицины, известно более 200 соединений с такими свойствами [100]. Однако в большинстве случаев, как и в случае с КК, эта способность описана на моделях беспозвоночных из-за их короткого жизненного цикла. Помимо способности увеличивать продолжительность жизни, потенциальные геропротекторы должны влиять на биомаркеры старения человека, обладать приемлемым уровнем токсичности и минимальной выраженностью побочных эффектов в терапевтической дозе, улучшать показатели здоровья и качество жизни [100]. Среди выявленных свойств КК была описана способность увеличивать продолжительность жизни нематод и дрозофил, снижать проявление возраст-ассоциированных патологий, активировать ответ митохондрий на неправильно свернутые белки (UPRmt) [12]. Однако данных, полученных только на беспозвоночных животных, недостаточно для оценки потенциала применения КК: помимо потенциальных геропротекторных свойств, для полисахаридов описаны антипролиферативные, антиоксидантные и другие свойства.

Хотя данных о влиянии КК на патогенез инфекционных заболеваний нет, роль полисахарида в формировании структуры биопленки позволяет предположить его вклад в тяжесть симптомов. Мукоидные штаммы *E. coli* часто находят в образцах стула и мокроты пациентов с муковисцидозом [101]. Мастит крупного рогатого скота лучше поддается лечению, если вызван штаммами, не продуцирующими КК [102]. Кроме того, КК может способствовать выживанию энтерогеморрагических штаммов *E. coli* в желудочно-кишечном тракте [18]. Однако есть данные о том, что капсулы с КК не защищают бактерий от фагоцитоза лейкоцитами и системы комплемента [20,103]. Также формирование капсулы с КК не является обязательным для развития инфекции *Salmonella* sp. у мышей [104,105].

Выполняя защитную функцию для отдельных бактериальных клеток и структурную функцию при формировании матрикса биопленки, КК может быть ассоциирована с отдельными инфекционными заболеваниями и обладает иммуногенностью. Однако данные о влиянии КК, получаемой с пищей, на организм нематод и их продолжительность жизни показывают новый потенциал применения КК, а том числе отделенной от бактериальных клеток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Получение КК из бактериальной культуры

2.1.1. Условия культивирования

Для получения КК выполнялось культивирование штамма *Escherichia coli* S17-3 pBhya-SAB (предоставлен доктором Sun Junsong, Китайская академия наук, Пекин). Согласно условиям культивирования, представленным в работе Sun Junsong [53], наибольший описанный в литературе выход КК был получен для этого штамма и составил 10,39 г/л. Для получения КК в условиях лаборатории, был подобран протокол культивирования, соблюдающий основные параметры культивирования: высокая концентрация глюкозы (20 г/л), рН 4,5, активная аэрация. Штамм сохранен в лаборатории в замороженном состоянии в растворе

глицерина (15%) при температуре - 80 °С (Arctiko ULTF 220) и на агаре LB (ампициллин 100 мкг/мл).

Согласно составленному протоколу, ночные культуры готовили в 3 мл среды в пробирках типа Фалькон объемом 15 мл. В качестве среды для ночных культур использовали среду LB (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л, pH = 7) с ампициллином (100 мкг/мл). Культивирование выполняли в течение 18–20 ч в шейкере (230 rpm) до оптической плотности 2.4. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Спектрофотометр УФ-3000» при длине волны 600 нм, в качестве сравнения использовали среду LB.

Для наработки КК штамм культивировали в специальных условиях, имитирующих описанные в оригинальном исследовании [53]. Штамм инкубировали в стеклянных колбах объемом 500 мл в среде LB (Miller, pH = 4,5) с солевым раствором M9 (10x; Na₂HPO₄*2H₂O 75,2 г/л, KH₂PO₄ 30 г/л, NaCl 5 г/л, NH₄Cl 5 г/л; pH = 4,5 или 6,5, корректируется HCl 1M), глюкозой (конечная концентрация 20 г/л) и ампициллином (100 мкг/мл). Штамм инкубировали в течение 24 часов при 37 °С, 230 об/мин (Biosan ES-20). Чтобы подтвердить влияние pH на продукцию КК, культивирование выполнялось при pH 4,5 и 6,5.

2.1.2. Протокол выделения и очистки КК

В работе В. Ф. Гебеля КК была выделена из жидкой культуры *E. coli* K235 [11] и была очищена от примесей, в том числе коломиновой кислоты и О-антигена [15]. В дальнейшем в других работах были разработаны протоколы выделения как из планктонной культуры [63], так и из биопленок [17], однако эти протоколы не включали отдельный этап очистки от коломиновой кислоты и О-антигена.

Коломиновая кислота – полимер N-ацетилнейраминовой кислоты [106] с молекулярной массой 3–4 кДа [107]. Таким образом, очистка от этого полисахарида возможна с помощью диализа. Выделение О-антигена как ЛПС из бактериальной культуры требует отдельных протоколов, таких как выделение с использованием горячей воды и фенола [108]. Снижение количества О-антигена в образце можно достичь, избегая нагрева бактериальной культуры и использования фенола.

Кроме того, в некоторых штаммах (например, *E. coli* K-12) КК связана с ЛПС, формируя М-антиген [56,89]. В таком случае, для выделения М-антигена также используется протокол с использованием фенола (осаждение фенол-хлороформом с добавлением петролейного эфира) и дальнейшей обработкой с ДНКазой I и РНКазой А [109]. Эти параметры были учтены при составлении собственного протокола выделения КК: для удаления коломиновой кислоты и других примесей использовался диализ, были исключены этапы нагрева и использования фенола.

Для выделения полисахарида было разработано два протокола, один из которых включал этап очистки от белков с использованием трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Несмотря на то, что часто для осаждения белков используют сульфат аммония [110,111], мы выбрали ТХУ, так как её добавление не оказывает влияния на полисахариды [112]. Кроме того, удаление белков с ТХУ позволяет снизить потери полисахаридов, а также осадить ДНК из образца [112,113], что особенно важно, так как КК может связываться с ДНК [14].

Протоколы № 1, 3, 4, 5 (без очистки от белка). К бактериальной культуре добавляли тетрациклин и хлорамфеникол (25 мкг/мл) и культуру инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Это позволяло инактивировать бактериальную культуру, не повреждая стенки клеток. Бактериальные клетки удаляли с помощью центрифугирования (10500 g, 15 мин., 25 °С; Eppendorf 5804R). Надосадочную жидкость концентрировали *in vacuo* до объема 200 мл и добавляли 3 объема этанола (95 %) для получения осадка полисахарида. Смесь надосадочной жидкости с этанолом выдерживали при 4 °С в течение 24 часов, после чего белый осадок отделяли с помощью центрифугирования (10500 g, 30 мин., 4 °С). Осадок растворяли в воде Milli-Q и очищали от примесей низкомолекулярных соединений методом диализа (12–14 кДа MWCO). Полученный раствор, содержащий КК, лиофилизировали (FreeZone 2.5 л Benchtop Freeze Dry System, Labconco). Полученный образец КК взвешивали и хранили при -20 °С.

Как вариации протокола №1, было протестировано использование большего объема этанола (95 %, 4:1) и ацетона (98 %, 3:1). Согласно данным литературы,

количества этанола для осаждения может различаться в зависимости от структуры полисахарида [114].

Протокол №2 (с этапом очистки от белка). К бактериальной культуре добавляли тетрациклин и хлорамфеникол (25 мкг/мл) и культуру инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Бактериальные клетки удаляли с помощью центрифугирования (10500 g, 15 мин., 25 °С; Eppendorf 5804R). Надосадочную жидкость концентрировали *in vacuo* до объема 200 мл и подвергали диализу (12–14 кДа MWCO). К диализированному раствору добавляли ТХУ до конечной концентрации 20 % [113] и инкубировали при 4 °С в течение 30 мин, после чего осадок, содержащий белки, отделяли центрифугированием (10500 g, 15 мин., 4 °С). К супернатанту добавляли этанол (95%) в соотношении 3:1 и инкубировали 24 ч при 4 °С. Осадок отделяли центрифугированием (10500 g, 15 мин., 4 °С) и лиофилизировали. Полученный образец КК взвешивали и хранили при -20 °С.

Основные различия протоколов выделения КК представлены в таблице 3.

Таблица 3. Протоколы выделения КК из бактериальной культуры штамма *E. coli* S17-3 рBhya-SAB, использованные в диссертационной работе.

Протокол № 1	Протокол № 2	Протокол № 3	Протокол № 4	Протокол № 5
Культивирование при рН = 4,5	Культивирование при рН = 6,5	Культивирование при рН = 6,5	Культивирование при рН = 6,5	Культивирование при рН = 4,5
Белки с ТХУ не удалялись	Белки с ТХУ не удалялись	Белки с ТХУ не удалялись	Белки с ТХУ не удалялись	Белки были осаждены с ТХУ
Осаждение полисахарида в этаноле (95%), 3:1	Осаждение полисахарида в этаноле (95%), 3:1	Осаждение полисахарида в этаноле (95%), 4:1	Осаждение полисахарида в ацетоне (98%), 3:1	Осаждение полисахарида в этаноле (95%), 3:1

2.1.3. Описание образцов КК

1 мг высушенного образца КК переносили в стеклянные пробирки с завинчивающейся крышкой размером 13 × 100 и гидролизировали в трифторуксусной кислоте (2 М, 2 ч., 120 °С). После этого образец испаряли в потоке сжатого воздуха при температуре 40 °С. В высушенный образец добавляли метанол, после чего образец снова высушивали.

Полученные в результате гидролиза сахара восстанавливали раствором борогидрида натрия (NaBH_4 , 0,25 М в 5 % NH_4OH ; 24 ч., 20 °С). К раствору добавляли ледяную уксусную кислоту и выпаривали для удаления остатков борогидрида. После этого к образцу трижды добавляли раствор уксусной кислоты в метаноле (10 %) и выпаривали, затем трижды добавляли метанол и выпаривали. Затем для реакции трифторацетилирования добавляли 200 мкл трифторуксусного ангидрида и пиридин. Раствор смешивали в вортексе и инкубировали 24 ч. при 20 °С. После этого раствор высушивали для удаления растворителя.

К образцу добавляли 1 мл воды Milli-Q и 1 мл этилацетата для разделения фаз полиолов и солей. Ацетаты полиолов отделяли и использовали для анализа моносахаридного состава методом ГХ-МС (Agilent 8860 GS System). По результатам анализа оценивали соотношение пиков моносахаридов и присутствие маннозы (маркер примесей других полисахаридов в образце).

2.2. Исследование влияния КК на клеточные линии млекопитающих (*in vitro*)

2.2.1. Клеточные линии

Для экспериментов были использованы клеточные линии колоректального рака (HCT-116), нейробластомы человека (IMR-32), постнатальные фибробласты человека (HPF), любезно предоставленные коллегами из Института канцерогенеза (Москва). миоцитов мыши (C2C12) и культура эпителия почки зеленой мартышки (Vero), предоставленные Уласевич С.А. (НОЦ Инфохимии, Университет ИТМО).

Линии HCT-116, IMR-32, HPF, C2C12 культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %, Gibco), L-

глутамин (1 %, Биолот) и пенициллин-стрептомицин (пенициллин 50 МЕ/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот). Линию Vero культивировали в среде α -MEM (Биолот) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %, Gibco), L-глутамин (1 %, Биолот) и пенициллин-стрептомицин (пенициллин 50 МЕ/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот). Инкубация проводилась при 37 °С, 5 % CO₂, в увлажненной атмосфере (инкубатор New Brunswick Galaxy, Eppendorf). В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста. Для исследования эффектов КК в клеточных линиях в качестве растворителя использовали соответствующую питательную среду.

2.2.2. Оценка жизнеспособности клеточных линий в присутствии КК

Для оценки жизнеспособности клеток в присутствии КК и косвенной оценки цитотоксичности в выбранных клеточных линиях использовался колориметрический анализ (МТТ-тест). Количество живых и метаболически активных клеток оценивалось путем измерения оптической плотности раствора в лунке, после добавления тетразолиевого красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) и его восстановления до нерастворимого формазана.

Анализ выполнялся в 96-луночной планшете (Eppendorf). В каждую лунку добавляли 100 мкл суспензии клеток (HCT116, HPF, Vero по 5000 клеток на лунку, IMR-32, C2C12 – 15000 клеток на лунку). После 24 часов инкубации суспензию с КК добавляли в каждую лунку в концентрации от 2 до 256 мкг/мл, после чего клетки инкубировали на протяжении 72 часов (37 °С, 5 % CO₂).

Для эксперимента использовали суспензии КК, полученной с использованием протокола № 5, полученные в серийных разведениях. В качестве отрицательного контроля использовали клеточные линии без добавления КК. После завершения инкубации, среду с неприкрепленными клетками отбрасывали, а в лунку добавляли 200 мкл раствора МТТ в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, 0,5 мг/мл) и инкубировали 90 минут (37 °С, 5 % CO₂). Раствор удаляли из лунок, а для

растворения гранул формазана в лунки добавляли 200 мкл диметилсульфоксиде (ДМСО), после чего аккуратно перемешивали на протяжении 15 минут.

Оптическую плотность полученной суспензии измеряли на планшетном спектрофотометре (Tecan Infinite) при длине волны 570 нм. Количество живых и метаболически активных клеток определяли как процент оптической плотности в лунках с образцом, нормированной к оптической плотности культуры без добавления КК. Для каждого значения процента жизнеспособности рассчитывали среднее арифметическое и стандартное отклонение.

2.2.3. Оценка влияния КК на морфологию клеток

Исследование проводилось на клеточных линиях НСТ-116, IMR-32 и C2C12. Клетки культивировали в 12-луночной планшете (Eppendorf) на круглых покровных стеклах (диаметр 11 мм, Thermo FS) в среде ДМЕМ (Биолот) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %, Gibco), L-глутамина (1 %, Биолот) и пенициллин-стрептомицина (пенициллин 50 МЕ/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот) в течение 24 часов (37 °С, 5 % CO₂). Затем питательную среду заменяли средой с КК (200 мкг/мл) и инкубировали в течение 72 часов. В качестве контроля использовали замену на питательную среду без КК.

После инкубации с КК клетки окрашивали флуоресцентным красителем MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Fisher), растворенным в питательной среде (250 мкМ) в течение 30 минут (37 °С, 5 % CO₂). Затем клетки трижды промывали с ФСБ для удаления избытка красителя и фиксировали раствором параформальдегида (4 %) в течение 15 минут. Зафиксированные клетки обрабатывали Triton X-100 (Sigma-Aldrich), промывали ФСБ, и затем окрашивали красителем DAPI (125 нг/мл, Thermo Fisher) для окрашивания ядер в течение 5 минут. Покровные стекла фиксировали на предметных стеклах с добавлением глицерина.

Образцы изучали и фотографировали на флуоресцентном микроскопе Leica DMi8 с камерой Leica DFC365FX (Leica, Германия) в родаминовом (585/40 нм) и DAPI (460/50 нм) каналах.

Анализ изображений проводили с использованием ImageJ 1.54j 12. Для этого в соответствии с длиной шкалы определялась длина клеток по крайним точкам и диаметр клеток. Были проанализированы все представленные в поле зрения клетки, оценивалось 20 полей зрения для каждой клеточной линии в контроле и после культивирования с КК. В дальнейшем для всех измерений было рассчитано среднее значение и стандартное отклонение. Проверка различий значений между группами проводилось с расчетом t-критерия Стьюдента, представлено в виде р-значения.

2.2.4. Проточная цитометрия для оценки кинетики гибели клеток миоцитов

Количество мертвых клеток в линии C2C12 оценивалось методом проточной цитофлуориметрии с использованием красителя пропидий йодид (PI, Thermo FS, максимум возбуждения 535 нм, максимум флуоресцентного излучения 617 нм).

Клетки культивировались на круглых покровных стеклах (диаметр 11 мм, Thermo FS) в среде ДМЕМ (Биолот) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %, Gibco), L-глутамин (1 %, Биолот) и пенициллин-стрептомицин (пенициллин 50 МЕ/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот) в течение 24 часов (37 °С, 5 % CO₂). Затем питательную среду заменяли средой с КК (50 и 200 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 часов. В качестве контроля использовали замену на питательную среду без КК. Во время культивирования с КК клетки каждый час переносили в пробирки и ресуспендировали в ФСБ. После этого клетки в течение 2 минут инкубировали в темноте в растворе PI в ДМЕМ (10 мкг/мл).

Интенсивность окрашивания оценивали на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, USA) в фикоэритриновом канале (585/42 нм). Данные анализировали с использованием программы CytExpert (Beckman Coulter, USA).

2.2.5. Оценка влияния КК на мембранный потенциал митохондрий и формирование АФК в клетках миоцитов

Исследование проводилось на клеточной линии C2C12. Для оценки уровня активных форм кислорода (АФК) использовалось окрашивание с красителем CM-H₂DCFDA (5-(и-6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат,

максимум возбуждения 492–495 нм, максимум флуоресцентного излучения 517–527 нм, Thermo Fisher) и измерение на проточном цитометре CytoFlex в канале FITC (525/40 нм) [115]. Клетки культивировались на круглых покровных стеклах (диаметр 11 мм, Thermo FS) в среде ДМЕМ (Биолот) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %, Gibco), L-глутамин (1 %, Биолот) и пенициллин-стрептомицина (пенициллин 50 МЕ/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот) в течение 24 часов (37 °С, 5 % CO₂). Затем питательную среду заменяли средой с КК (50 и 200 мкг/мл) и инкубировали в течение 72 часов. В качестве контроля использовали замену на питательную среду без КК, но с добавлением H₂O₂ (5 мМ). После инкубации клетки переносили в пробирки и ресуспендировали в ФСБ. После этого к клеткам добавляли краситель CM-H₂DCFDA (5 мкМ) и инкубировали 1 час (37 °С, 5 % CO₂). После окрашивания, уровень АФК оценивали на проточном цитометре в FITC канале.

Для анализа количества активных митохондрий использовали краситель MitoTracker™ Red CMXRos (максимум возбуждения 579 нм, максимум флуоресцентного излучения 599 нм, Thermo Fisher). Этот краситель окрашивает митохондрии в живых клетках в зависимости от их мембранного потенциала.

Клетки культивировались на круглых покровных стеклах (диаметр 11 мм, Thermo FS) в среде ДМЕМ (Биолот) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %, Gibco), L-глутамин (1 %, Биолот) и пенициллин-стрептомицина (пенициллин 50 МЕ/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот) в течение 24 часов (37 °С, 5 % CO₂). Затем питательную среду заменяли средой с КК (50 и 200 мкг/мл) и инкубировали в течение 72 часов. В качестве контроля использовали замену на питательную среду без КК. После этого к клеткам добавляли раствор красителя MitoTracker™ Red CMXRos в питательной среде ДМЕМ (150 мкМ) и инкубировали в течение 30 минут (37 °С, 5 % CO₂). После инкубации с красителем клетки переносили в пробирки и ресуспендировали в ФСБ. После этого клетки дополнительно окрашивали MitoTracker™ Red CMXRos путем добавления раствора красителя в ФСБ (85 нМ).

Интенсивность окрашивания оценивали на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, USA) в фикоэритриновом канале (585/42 нм). Данные анализировали с использованием программы CytExpert (Beckman Coulter, USA).

2.3. Исследование эффектов КК на мышах (*in vivo*)

2.3.1. Анализ субхронической токсичности КК

Данная часть исследования выполнялась в соответствии с общими рекомендациями по проведению доклинических испытаний [116,117] и принципам работы с животными, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Исследование проводилось на самках аутбредных мышей ICR(CD-1) в возрасте 4 месяцев и массой тела 22 ± 0.3 г. Все протоколы экспериментов были утверждены локальным этическим комитетом и признаны соответствующими директиве по использованию лабораторных животных [118].

Животные содержались в индивидуальных клетках в условиях свободного доступа к воде и пище, стандартный рацион. В помещении поддерживались следующие условия: температура 22 ± 2 °С, относительная влажность 55 ± 10 %, цикл день/ночь длительностью 12 часов. Поскольку в предыдущих исследованиях КК применялась как компонент рациона [12], мы также растворяли КК в питьевой воде, т. е. мыши получали КК перорально путем пассивного выпаивания. Такой путь введения был выбран как наиболее подходящий с этической и технической точки зрения [119].

Мыши были случайным образом распределены на 5 групп (контрольная и четыре экспериментальные), по пять животных в группе (общее число животных – 25). Первая группа была контрольной, животные получали воду без дополнительных компонентов. Экспериментальные группы получали по 2,7 мг,

10,7 мг, 16 мг и 21,3 мг КК в сутки, что соответствует 0,1 мг, 0,5 мг, 0,75 мг и 1 мг на 1 г веса животного.

Для оценки субхронической токсичности животные получали КК в течение 30 дней. При этом производилась оценка массы тела 3 раза в неделю и визуальная оценка состояния шерсти и кожных покровов, стула, пищевого поведения и физической активности животных. Анализ динамики изменения массы тела выполнялся в программе Statistica 10 и Microsoft Excel. Для каждой группы и каждого дня измерения рассчитывали среднее арифметическое и стандартное отклонение. Достоверность различий оценивалась с использованием теста Краскела-Уоллиса и критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферони на множественное сравнение.

На 30 день эксперимента животных усыпляли инъекцией золетила и ксилазина. После этого выполнялась лапароторакотомия с извлечением и взвешиванием сердца, печени и почек. Для каждого органа рассчитывали среднюю массу по группе с учетом стандартной ошибки среднего. Относительную массу органов рассчитывали как отношение средней массы органа к средней массе тела животных, умноженное на 100 %. Достоверность различий оценивалась с использованием теста Краскела-Уоллиса и критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферони на множественное сравнение.

2.3.2. Оценка влияния КК на физическую активность животных в тесте вынужденного плавания

Данная часть исследования выполнялась в соответствии с общими рекомендациями по проведению доклинических испытаний [116]. Исследование проводилось на самках аутбредных мышей ICR(CD-1) в возрасте 4 месяцев и массой тела 22 ± 0.3 г. Все протоколы экспериментов были утверждены локальным этическим комитетом и признаны соответствующими директиве по использованию лабораторных животных [118].

Животные содержались в индивидуальных клетках в условиях свободного доступа к воде и пище, стандартный рацион. В помещении поддерживались

следующие условия: температура 22 ± 2 °С, относительная влажность 55 ± 10 %, цикл день/ночь длительностью 12 часов. Поскольку в предыдущих исследованиях КК применялась как компонент рациона [12], мы также растворяли КК в питьевой воде, т. е. мыши получали КК перорально путем пассивного выпаивания.

Животные были разделены на две группы (контрольная и экспериментальная), по 15 мышей в каждой (общее количество 30). Контрольная группа получала воду без дополнительных компонентов. 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 [120], модифицированный по рекомендациям Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства Министерства здравоохранения Российской Федерации [121].

Эксперимент длился 18 дней, измерения проводились в первый, третий, седьмой и восемнадцатый день. Количество измерений было ограничено с целью снижения эффекта тренировки. В первом этапе измерялось время плавания мышей с нагрузкой (5 % от массы тела). После первого этапа мыши отдыхали в течение 5 минут, после чего был второй этап плавания для достижения максимального утомления. После этого мыши отдыхали в течение 45 минут, затем измеряли время заплыва в третьем этапе.

Соотношение времени последнего и первого заплыва использовалось как показатель выносливости животных при длительной нагрузке. В соответствии с рекомендациями [121], значение индекса менее 0,5 указывает на низкую способность к восстановлению после физической нагрузки. Измерение времени заплыва после утомления также применяется для оценки выносливости [122,123]. Есть различные вариации этого теста с разным дополнительным весом [121,123]. Данный метод также применяется для исследования различных пищевых и биологически активных добавок [122–124].

2.3.3. 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 маленькие фрагменты левых желудочков помещали в раствор глутарового альдегида (2,5 % в фосфатном буфере (pH = 7,4), Sigma Aldrich, Германия) и фиксировали не менее 1 ч при комнатной температуре (25 °C). После фиксации в альдегиде фрагменты желудочков фиксировали в тетраоксиде осмия (1 % раствор). Образцы дегидрировали в возрастающих концентрациях этанола и ацетоне, затем заливали коммерческим составом эпоксидной смолы низкой плотности (Spurr Low Viscosity Embedding Kit, Sigma-Aldrich). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы с помощью стеклянного ножа, затем из отдельных секций делали ультратонкие срезы с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме UC7 (Leica). Полученные ультратонкие срезы помещали на медные решетки и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по методу Reynolds [125]. Образцы анализировали на высоковольтном микроскопе H-700Y Hitachi (200кВ). Левые желудочки сердца были выбраны для исследования как наиболее информативные при исследовании структурно-функциональных изменений миокарда [126].

Анализ изображений проводили с использованием ImageJ 1.54j 12 по ранее опубликованному протоколу [127]. Для анализа митохондрий и лизосом использовалась опция анализа области интереса (ROI manager), площадь и периметр митохондрий определялся с использованием инструмента ручного выделения. Были проанализированы все представленные в поле зрения органоиды, оценивалось по 20 полей зрения для каждой группы. В дальнейшем для всех измерений было рассчитано среднее значение, стандартное отклонение. Проверка различий значений между группами проводилось с расчетом t-критерия Стьюдента, представлено в виде р-значения.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Оптимизация протокола выделения КК

Основные результаты по оптимизации протокола выделения и очистки КК опубликованы в статье [128]. Полученные результаты по исследованию образцов КК, полученных в результате культивирования и выделения по разным протоколам, представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Сравнение образцов КК, полученных при использовании разных протоколов культивирования и выделения.

	Протокол №1	Протокол №2	Протокол №3	Протокол №4	Протокол №5
Выход из 1 л культуры, мг	1025,6	75,8	98	144	213,8
Визуальная оценка высушенного образца	Кремово-бежевый цвет, хлопьевидный	Кремово-бежевый цвет, хлопьевидный	Кремово-бежевый цвет, хлопьевидный	Пленка коричневого цвета	Белый, волокнистый
Содержание маннозы	Низкое	Высокое	Высокое	Высокое	Низкое
Другие моносахариды	Фукоза, глюкоза, галактоза	Фукоза, глюкоза, галактоза	Фукоза, глюкоза, галактоза	Фукоза, глюкоза, галактоза	Фукоза, глюкоза, галактоза

3.1.1. Анализ образцов КК, полученных при использовании разных протоколов культивирования и выделения

Наибольший выход получился при использовании протоколов №1 и №5 (1025,6 и 213,8 мг из 1 л культуры). При использовании других протоколов (№ 2, 3, 4) при культивировании использовался рН 6,5, что привело не только к снижению

продукции полисахаридов, но и к появлению примесей, что соответствует описанию свойств штамма [53]. В биосинтезе КК манноза является предшественником фукозы [64], поэтому мы предполагаем, что в этих условиях синтез целевого продукта был значительно снижен. Для наработки КК для дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo* было выбрано культивирование штамма при рН 4,5.

Сравнение разных осадителей полисахаридов оценивалось в протоколах № 2, 3, 4, так как в этом случае наблюдалась предположительно смесь полисахаридов. Ацетон (98 %) позволяет осадить большее количество компонентов (144 мг из 1 л культуры) чем этанол (75,8 и 98 мг на 1 л культуры), однако при этом формируется значительно окрашенный гелеобразный осадок, при лиофилизации формирующий коричневую пленку, что может быть связано с соосаждением веществ, не являющихся полисахаридами. По этой причине, в дальнейшем ацетон не использовался для получения КК. Использование большего объема этанола позволяет получить большее количество КК, однако для рутинной работы было выбрано соотношение 3:1.

Соблюдая протокол культивирования при рН = 4,5 и способа осаждения полисахаридов (этанол, 95 %, 3:1), мы получили 1025,6 мг из 1 л культуры при отсутствии этапа очистки (рисунок 6) от белков и 213,8 мг из 1 л культуры при осаждении белков ТХУ (рисунок 6). Образец дополнительно очищенной КК представляет собой волокнистую массу, похожую на вату. Вещество растворимо в воде, раствор прозрачный и вязкий, что соответствует описанию вещества из литературы [11].

По сравнению с этим образцом, образец, полученный при использовании протокола №1 более окрашен и формирует хлопья, при растворении в воде формирует мутный раствор. Осаждение с ТХУ снижает выход в 4,5 раз, что показывает высокое содержание белков и ДНК в образце [112]. Это указывает на необходимость этапа осаждения с ТХУ, что было учтено в данной работе, в отличие от ранее описанных протоколов [11,12,22,53].

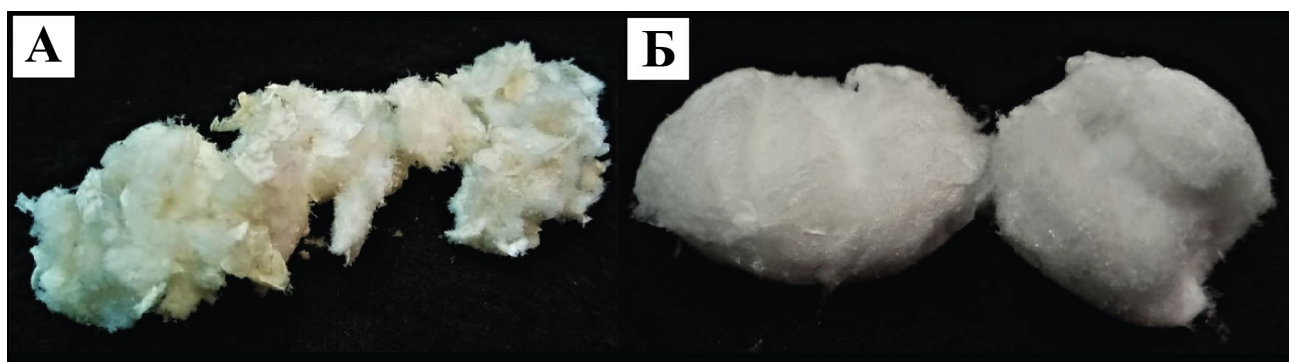


Рисунок 6 – (А) Образец КК, полученный при использовании протокола № 1 (рН при культивировании 4,5; осаждение этанолом (3:1); без этапа очистки от белков). Наблюдается бежевый оттенок и неоднородность текстуры, формирование хлопьев. (Б) Образец КК, полученный при использовании протокола № 5 (рН при культивировании 4,5; осаждение этанолом (3:1); с этапом очистки от белков). Образец имеет белую окраску и волокнистую структуру, напоминающую вату.

3.1.2. Анализ полученных образцов методом ГХ-МС

Все полученные образцы были проанализированы методом ГХ-МС (рисунки 7–11). Во всех образцах были обнаружены моносахариды, характерные для КК – фукоза (Fuc), глюкоза (Glc) и галактоза (Gal), представленные в соотношении 1:2:2, что подтверждает то, что полученный полисахарид является КК. Однако высокое содержание маннозы (Man) в образцах, полученных при использовании протоколов № 2, 3, 4 указывает на соосаждение других полисахаридов, возможно, маннана.

Высокое содержание маннана характерно для биопленок *E. coli* и патогенов из группы ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) [129], поэтому полученный результат подчеркивает необходимость выбора протокола №5 для исследований *in vitro* и *in vivo*.

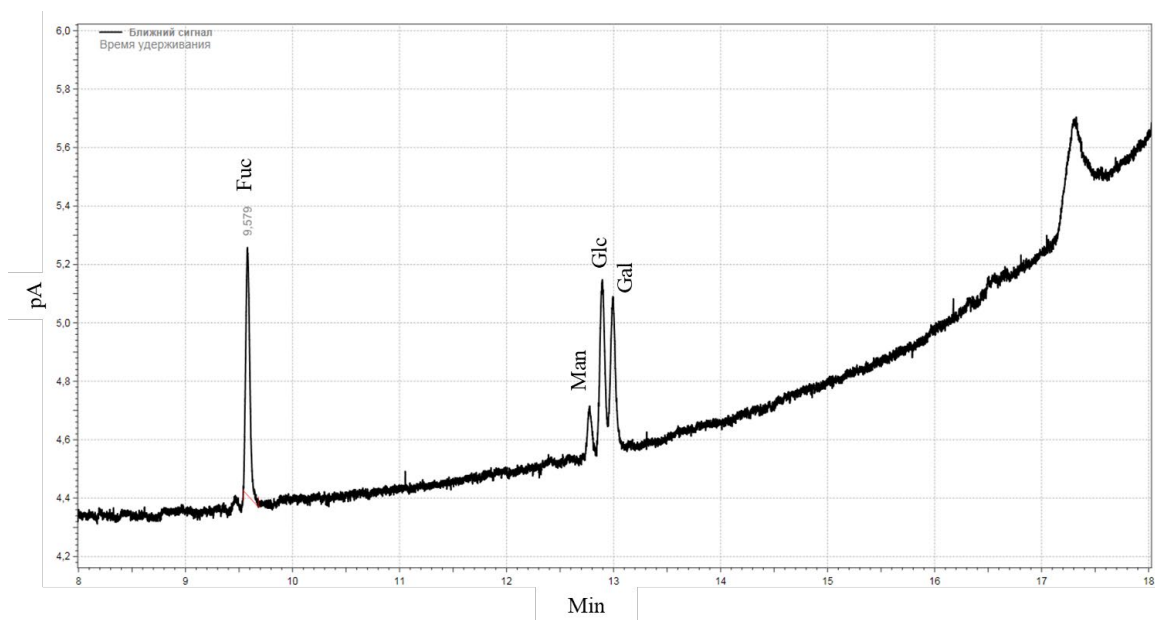


Рисунок 7 – Спектр ГХ-МС образца, полученный при использовании протокола №1.

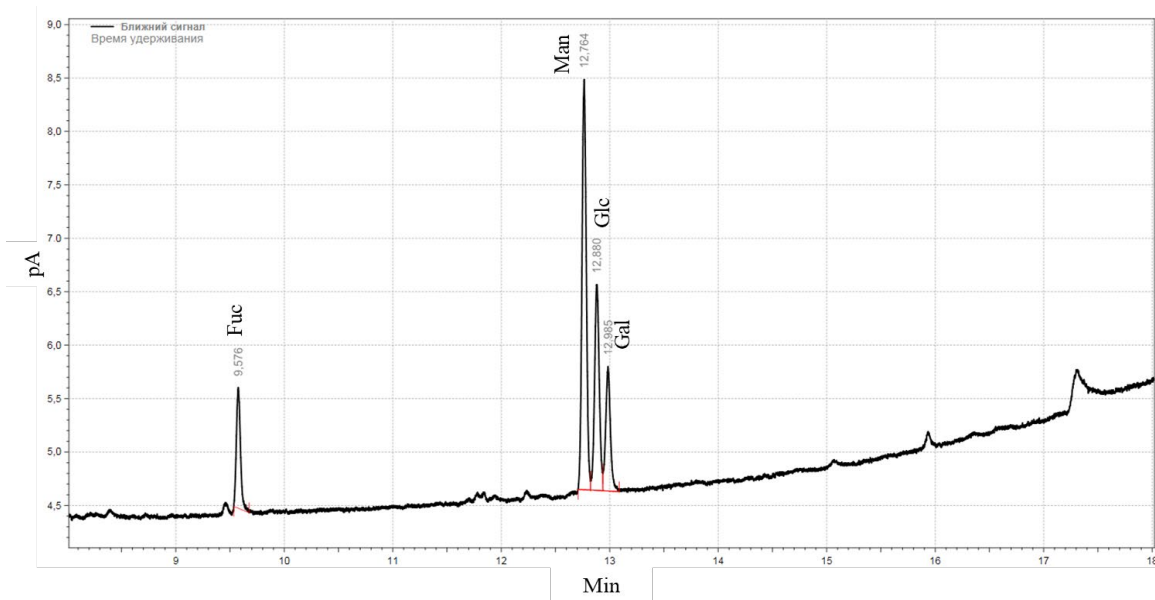


Рисунок 8 – Спектр ГХ-МС образца, полученный при использовании протокола №2.

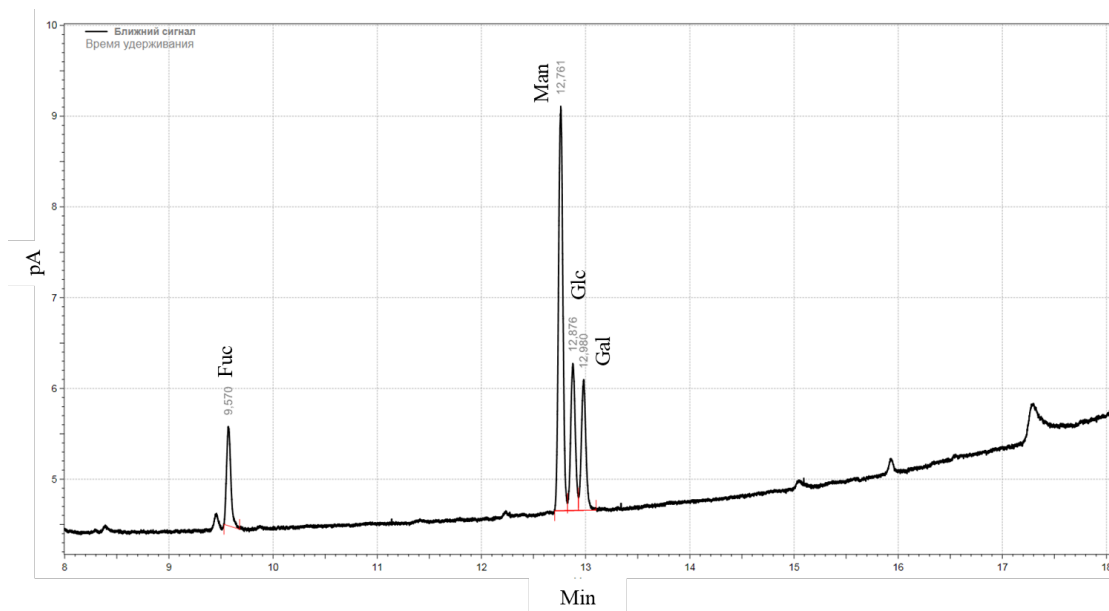


Рисунок 9 – Спектр ГХ-МС образца, полученный при использовании протокола №3.

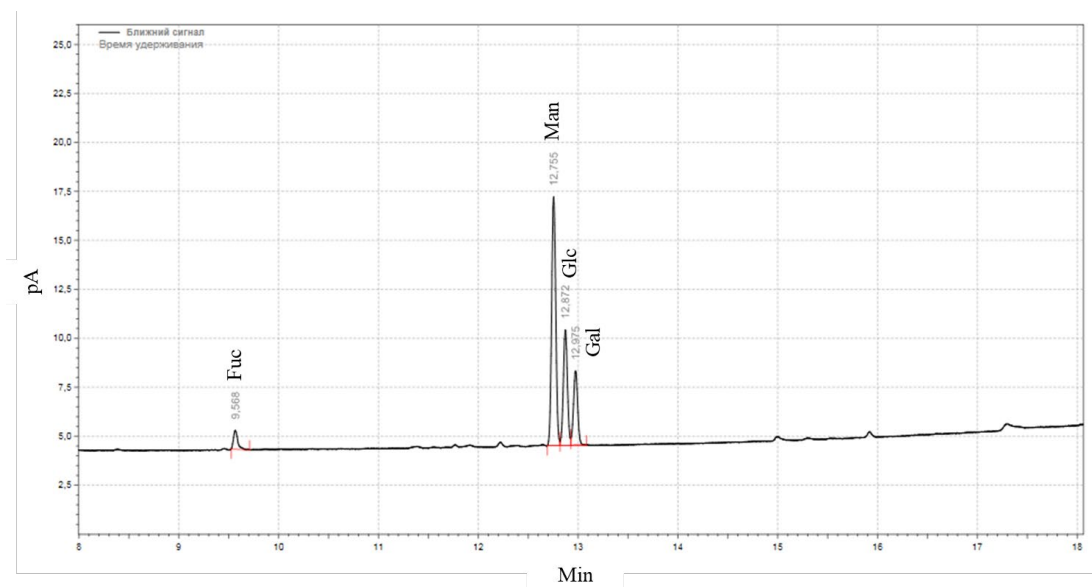


Рисунок 10 – Спектр ГХ-МС образца, полученный при использовании протокола №4.

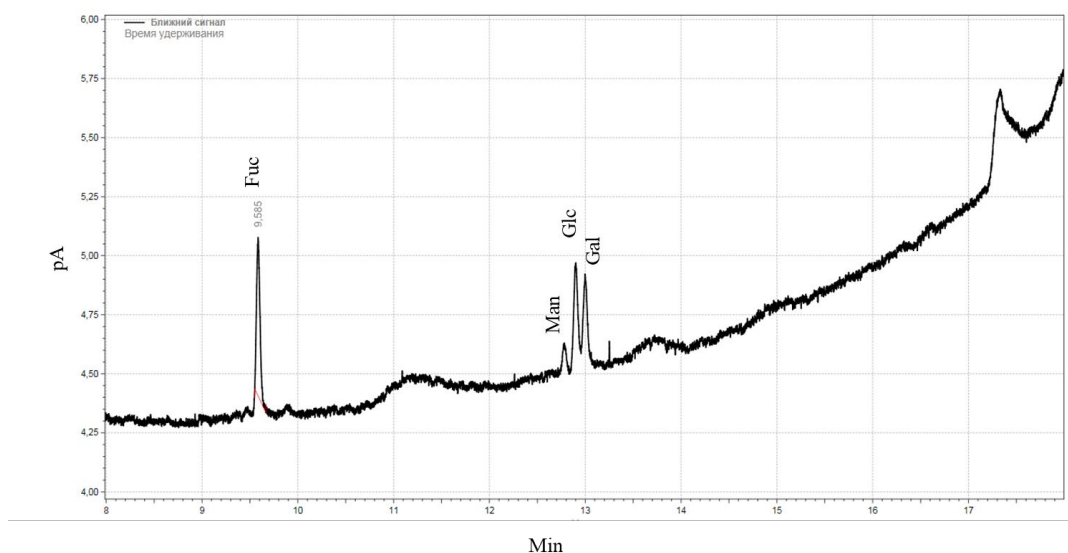


Рисунок 11 – Спектр ГХ-МС образца, полученный при использовании протокола №5.

3.1.3. Выводы о применении протоколов выделения и очистки для получения КК

Одним из первых этапов исследования стала оптимизация протокола выделения КК из бактериальной культуры. Было разработано пять вариантов протокола культивирования и выделения КК [128]. Для создания оптимальных условий среды, с учетом количества углеводов и стабильного поддержания pH, был разработан протокол, предполагающий объединение среды LB с добавлением глюкозы и смеси солей M9 для поддержания буферных свойств и стабилизации pH. Для удаления низкомолекулярных соединений, в том числе колониновой кислоты, в протокол был добавлен этап диализа. Удаление O-антигена является отдельной задачей и обычно достигается с помощью, например, гель-фильтрационной хроматографии, однако в данном протоколе его содержание снижалось за счет осаждения бактериальной культуры и отсутствия этапа кипячения, в отличие от ранее описанных протоколов. КК может связывать белки и ДНК, поэтому при создании протокола исключалось осаждение с фенолом, а также был добавлен этап осаждения белков с ТХУ. Полученный выход КК составил 213,8 мг из 1 л бактериальной культуры.

3.2. Исследование биологических эффектов КК *in vitro*

Материалы и результаты раздела опубликованы в статьях [130,131].

3.2.1. Оценка жизнеспособности клеточных линий в присутствии КК

Две из пяти исследуемых клеточных линий (Vero, HPF) не показали значительного снижения жизнеспособности при добавлении КК в широком диапазоне концентраций (2 – 256 мкг/мл).

Жизнеспособность клеточной культуры C2C12 снижалась при концентрации КК 256 мкг/мл до 70%. Вероятно, это может быть связано с влиянием КК на дифференцировку этой клеточной линии (раздел 3.2.2). Другие клеточные линии не опухолевого происхождения (Vero, HPF) не показали значимых изменений оптической плотности в МТТ тесте (рисунок 12).

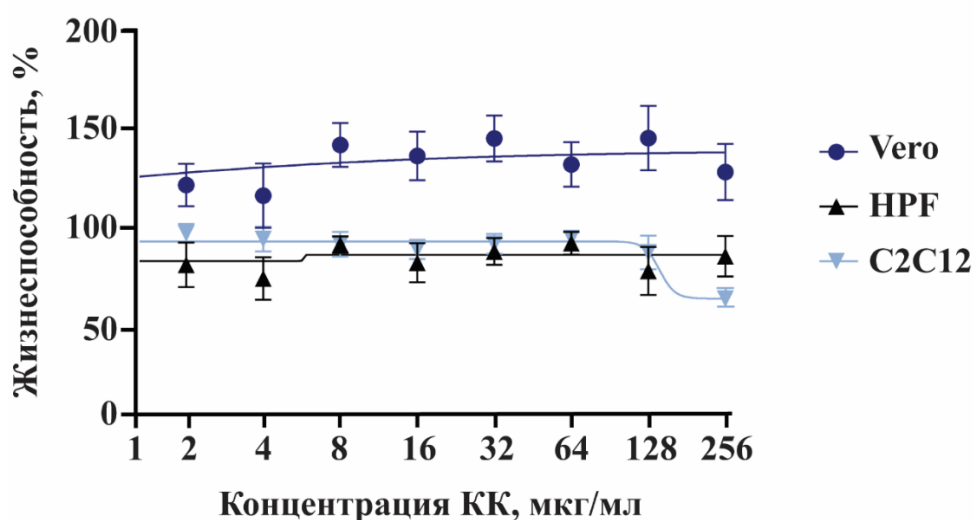


Рисунок 12 – Жизнеспособность клеток Vero (синий круг), HPF (черный треугольник) и C2C12 (голубой треугольник) после 72 часов культивирования в присутствии разных концентраций КК. За 100 % жизнеспособность принято значение оптической плотности при культивировании без КК. Показаны средние значения трех независимых экспериментов с указанием стандартного отклонения.

Оценка влияния КК на жизнеспособность клеточных культур была также проведена для клеточных линий НСТ-116 и IMR-32, имеющих опухолевое происхождение (рисунок 13). Наблюдается снижение жизнеспособности клеток при концентрациях КК выше 64 мкг/мл, при концентрации 256 мкг/мл – до 85 %, предположительно, это связано с антипролиферативными свойствами КК в отношении клеток опухолевого происхождения. Согласно данным литературы, КК имеет противоопухолевый эффект *in vivo* в отношении герминогенных опухолей нематод *Caenorhabditis elegans* [12], однако для опухолевых клеток млекопитающих этот эффект продемонстрирован впервые.

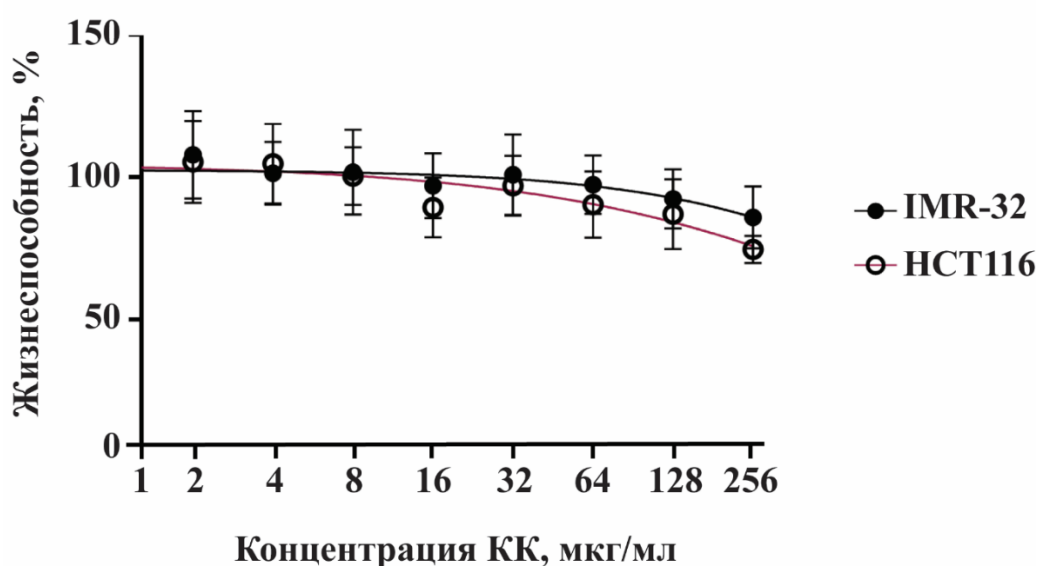


Рисунок 13 – Жизнеспособность клеток IMR-32 (темный круг) и НСТ-116 (белый круг) после 72 часов культивирования в присутствии разных концентраций КК. За 100 % жизнеспособность принято значение оптической плотности при культивировании без КК. Показаны средние значения трех независимых экспериментов с указанием стандартного отклонения.

Для сравнения, β -D-глюкан не обладает антипролиферативной активностью при концентрации 400 мг/мл [132], показатель IC₅₀ для других полисахаридов может находиться в диапазоне 80–150 мкг/мл для разных клеточных линий [50].

3.2.2. Анализ влияния КК на морфологию клеток

Для этой части работы была выбрана клеточная линия не опухолевого происхождения, показавшая изменение жизнеспособности в МТТ-тесте – линия миобластов мыши, С2С12 (рисунок 14). В контрольной культуре клетки имеют вытянутую или треугольную форму, расположены в монослое хаотично. При культивировании с КК (200 мкг/мл) в клеточной линии С2С12 наблюдается изменение морфологии: клетки становятся более вытянутыми (таблица 5, увеличение отношения длины к ширине с $2,2 \pm 0,9$ до $4,3 \pm 2,3$) и формируют отростки, ядра выстраиваются в одну линию. Это типичные признаки дифференцировки клеток по пути миогенеза и превращения в мышечные трубочки [133] (рисунок 14).

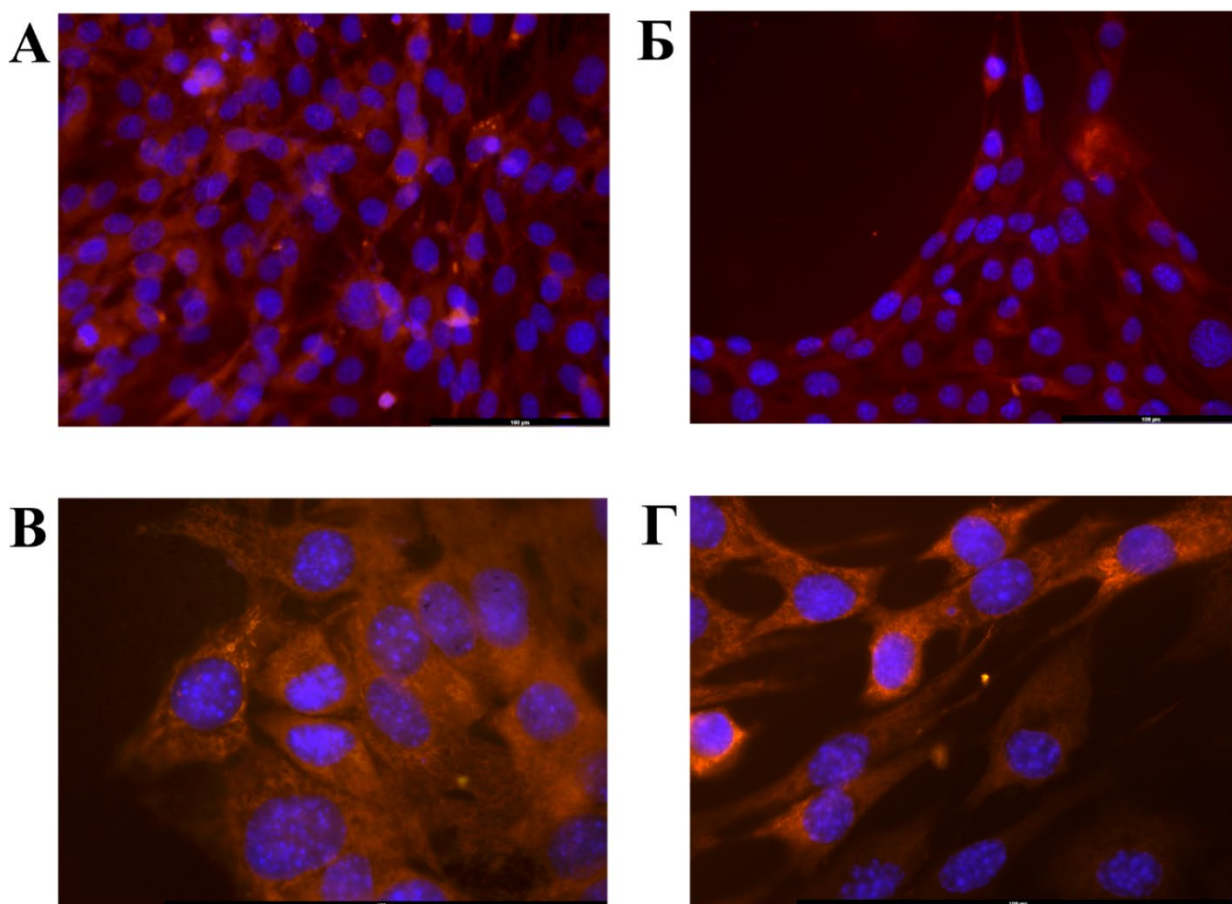


Рисунок 14 – Изменение морфологии клеток миоцитов линии С2С12 при культивировании с КК в концентрации 200 мкг/мл (Б – увеличение 20х, Г – увеличение 100х). Культура в контроле: А – увеличение 20х, В – увеличение 100х.

Таблица 5 – Изменения морфологии клеток линии C2C12 после 72 часов культивирования с КК (200 мкг/мл). Указаны средние значения и стандартное отклонение, значимость различий определялась с использованием t-критерия Стьюдента.

	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Отношение длины к ширине
Контроль	34,7 ± 10	17,3 ± 7,1	2,2 ± 0,9
После культивирования с КК (200 мкг/мл)	45,3 ± 17,7	11,6 ± 2,7	4,3 ± 2,3
p значение	0,122	0,035	0,02

Поскольку накопление красителя MitoTracker Red зависит от мембранного потенциала, он дает возможность визуализировать расположение митохондрий в клетке. Влияние КК на митохондрии клеточной линии фибробластов мышцы NIH/3T3 было описано в работе [12], где показали, что добавление КК к клеточной культуре индуцирует деление митохондрий. В полученных изображениях клеточной линии C2C12 мы не можем зафиксировать изменение размера или расположения митохондрий, поэтому был проведен дополнительный анализ влияния КК на митохондриальный потенциал и антиоксидантные свойства клетки (раздел 3.2.4).

Анализ, проведенный на клеточных линиях опухолевого происхождения, также показавших снижение жизнеспособности (HCT-116, IMR-32), не показал изменения морфологии клеток (рисунок 15, таблицы 6 и 7).

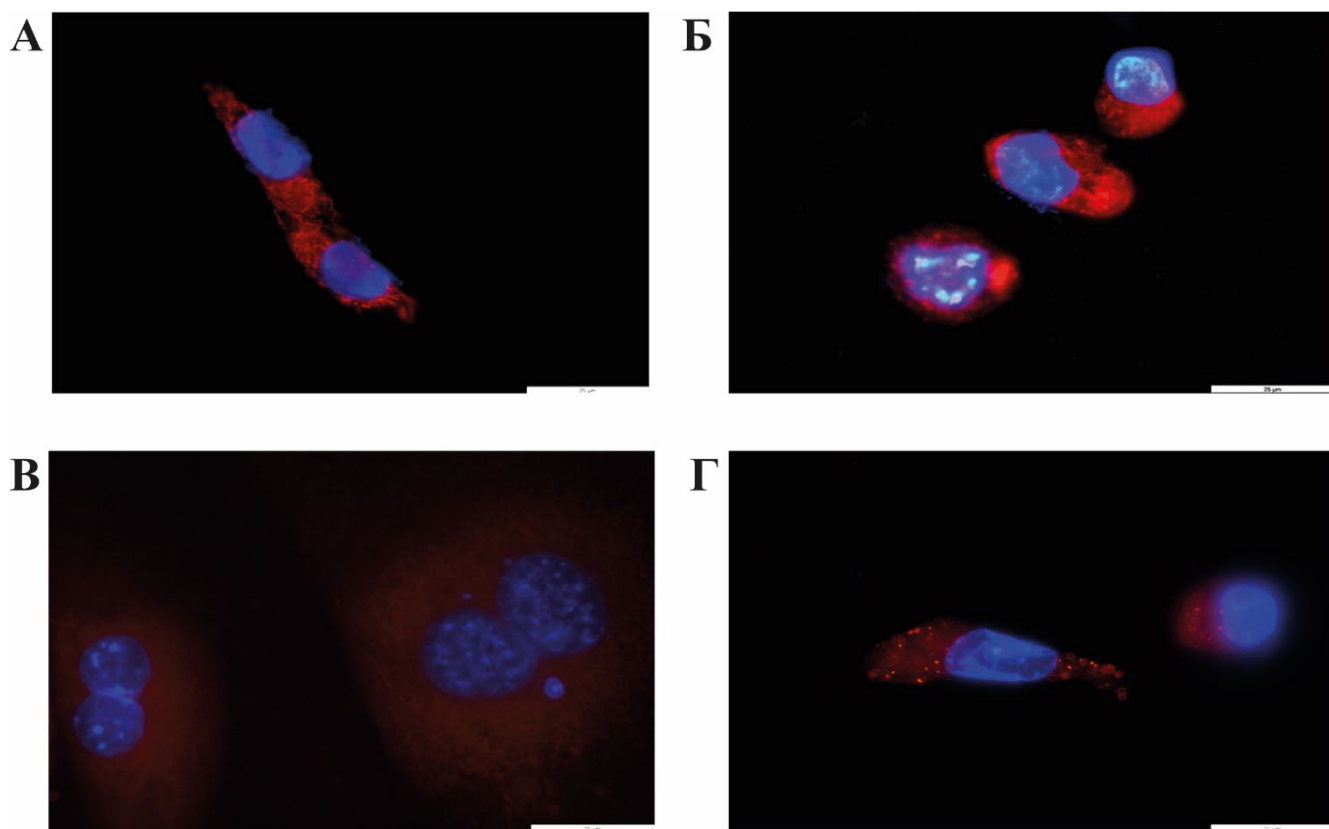


Рисунок 15 – Морфология клеточных линий НСТ-116 (А, контроль) и IMR-32 (В, контроль) не изменилась при культивировании с КК в концентрации 200 мкг/мл. Микрофотографии по окончании культивирования: НСТ-116 (Б), IMR-32 (Г).

Таблица 6 – Динамика морфологии клеток линии НСТ-116 после 72 часов культивирования с КК (200 мкг/мл). Указаны средние значения и стандартное отклонение, значимость различий определялась с использованием t-критерия Стьюдента.

	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Отношение длины к ширине
Контроль	$27,9 \pm 5,6$	$13 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,6$
После культивирования с КК (200 мкг/мл)	$30,4 \pm 7,7$	$14,8 \pm 5,3$	$2,2 \pm 0,6$
р значение	0,513	0,435	0,97

Таблица 7 – Динамика морфологии клеток линии IMR-32 после 72 часов культивирования с КК (200 мкг/мл). Указаны средние значения и стандартное отклонение, значимость различий определялась с использованием t-критерия Стьюдента.

	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Отношение длины к ширине
Контроль	26,5 ± 3,7	13,5 ± 3,5	2 ± 0,2
После культивирования с КК (200 мкг/мл)	27 ± 2	17,7 ± 4,7	1,6 ± 0,45
p значение	0,83	0,285	0,258

3.2.3. Анализ влияния КК на клеточную гибель в линии миоцитов

Так как для клеточной линии C2C12 были получены отличительные от других линий результаты оценки жизнеспособности и морфологии, была проведена оценка количества погибших клеток в культуре.

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 (рисунок 16), 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 [134].

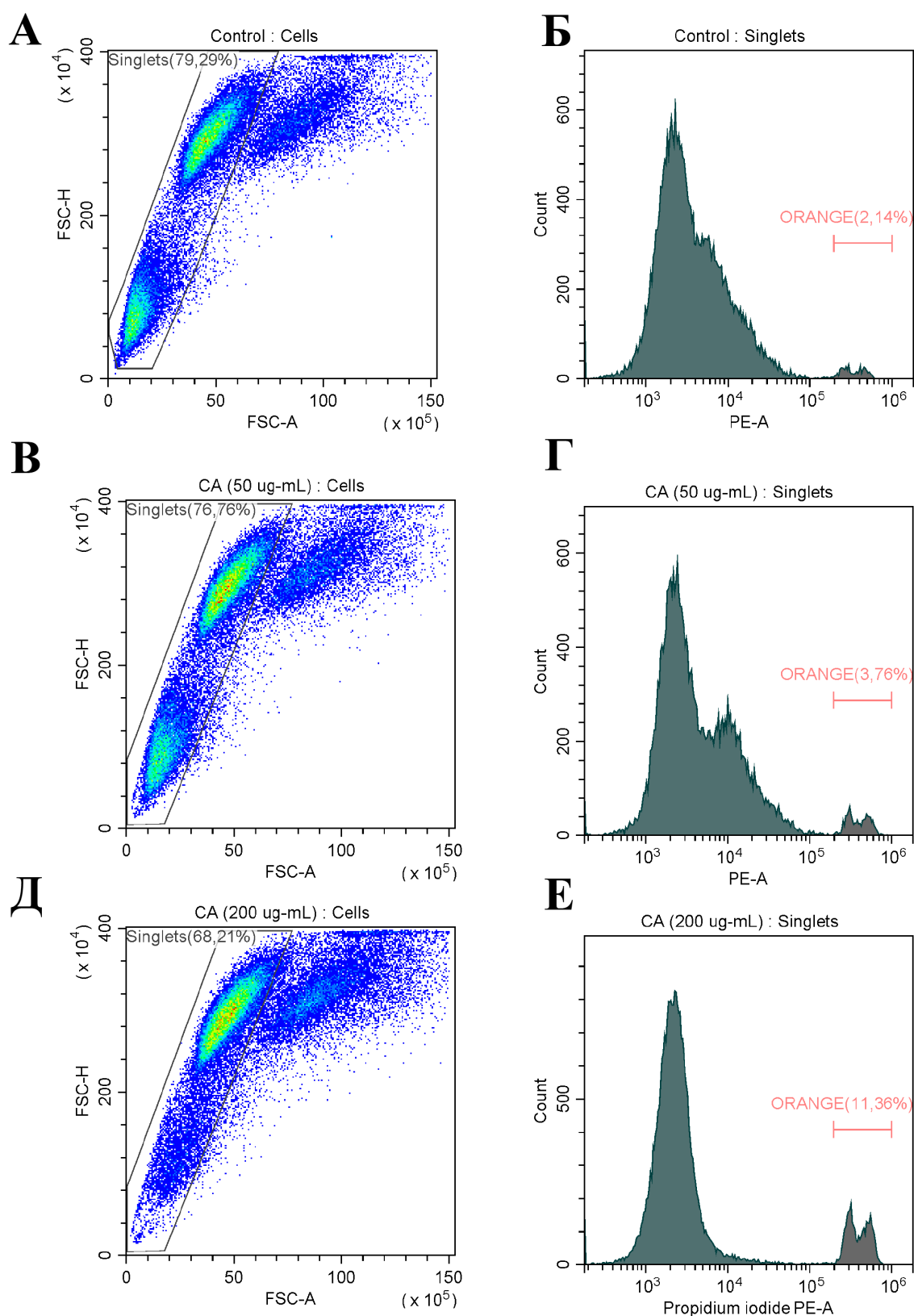


Рисунок 16 – Результаты анализа распределения количества живых и мертвых клеток в культуре миоцитов (C2C12) по окончании 24 часов культивирования с КК в концентрациях 50 и 200 мкг/мл. А. Точечный график распределения клеток в контроле (без добавления КК), количество одиночных клеток 79 %. Б. График

распределения популяции клеток, количество мертвых клеток 2 %. В. Точечный график, культивирование с добавлением 50 мкг/мл КК, количество одиночных клеток 77 %. Г. График распределения популяции клеток, количество мертвых клеток 4 %. Д. Точечный график, культивирование с добавлением 200 мкг/мл КК, количество одиночных клеток 68 %. Е. График распределения популяции клеток, количество мертвых клеток 11 %. Окрашивание PI.

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 (рисунок 17). 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. Было выявлено, что при концентрации КК 50 мкг/мл в питательной среде, количество флуоресцирующих клеток увеличивалась с 61,5 %, детектируемого в контроле, до 77 %. Воздействие КК в концентрации 200 мкг/мл приводит к сокращению количества клеток с уровнем АФК выше порогового значения до значений контроля (62,3 %). Повышенная продукция АФК является характерной чертой процесса дифференцировки миоцитов линии C2C12 [135], 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 [41].

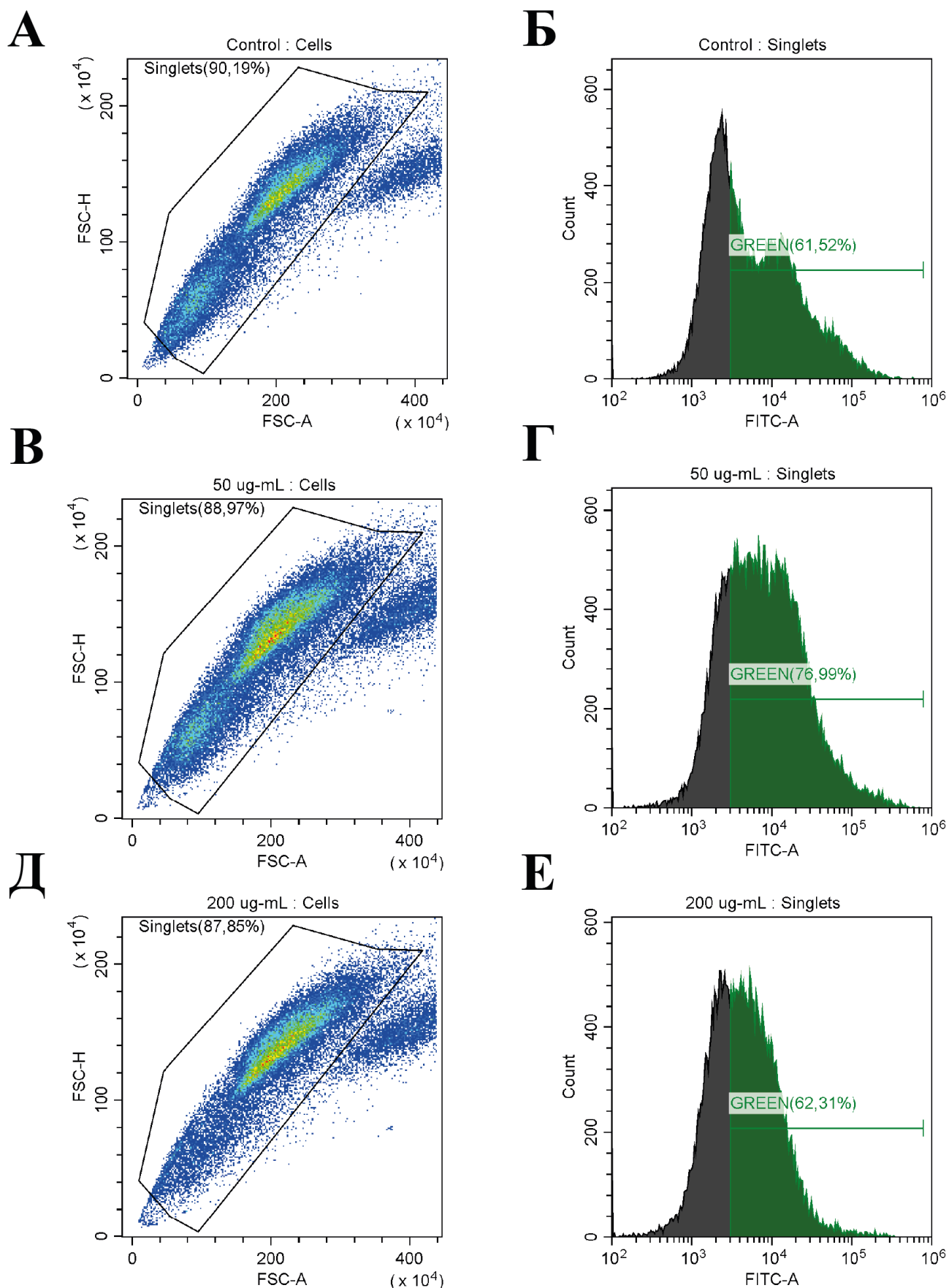


Рисунок 17 – Результаты анализа продукции АФК клетками миоцитов C2C12 при окрашивании CM-H₂DCFDA. А. Точечный график распределения популяции

клеток при культивировании без добавления КК, количество одиночных клеток 90 %. Б. График распределения популяции клеток; в зеленом спектре (окрашенные CM-H₂DCFDA) 62 %, медиана 4403,7. В. Точечный график распределения популяции клеток при культивировании с добавлением КК 50 мкг/мл, количество одиночных клеток 89 %. Г. График распределения популяции клеток; в зеленом спектре (окрашенные CM-H₂DCFDA) 77 %, медиана 7137,1. Д. Точечный график распределения популяции клеток при культивировании с КК 200 мкг/мл, количество одиночных клеток 88 %. Е. График распределения популяции клеток; в зеленом спектре (окрашенные CM-H₂DCFDA) 62 %, медиана 4135,2.

Количество активных митохондрий измеряли методом проточной цитометрии и окрашивания красителем MitoTracker™ Red CMXRos, зависимым от митохондриального потенциала (рисунок 18). 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.

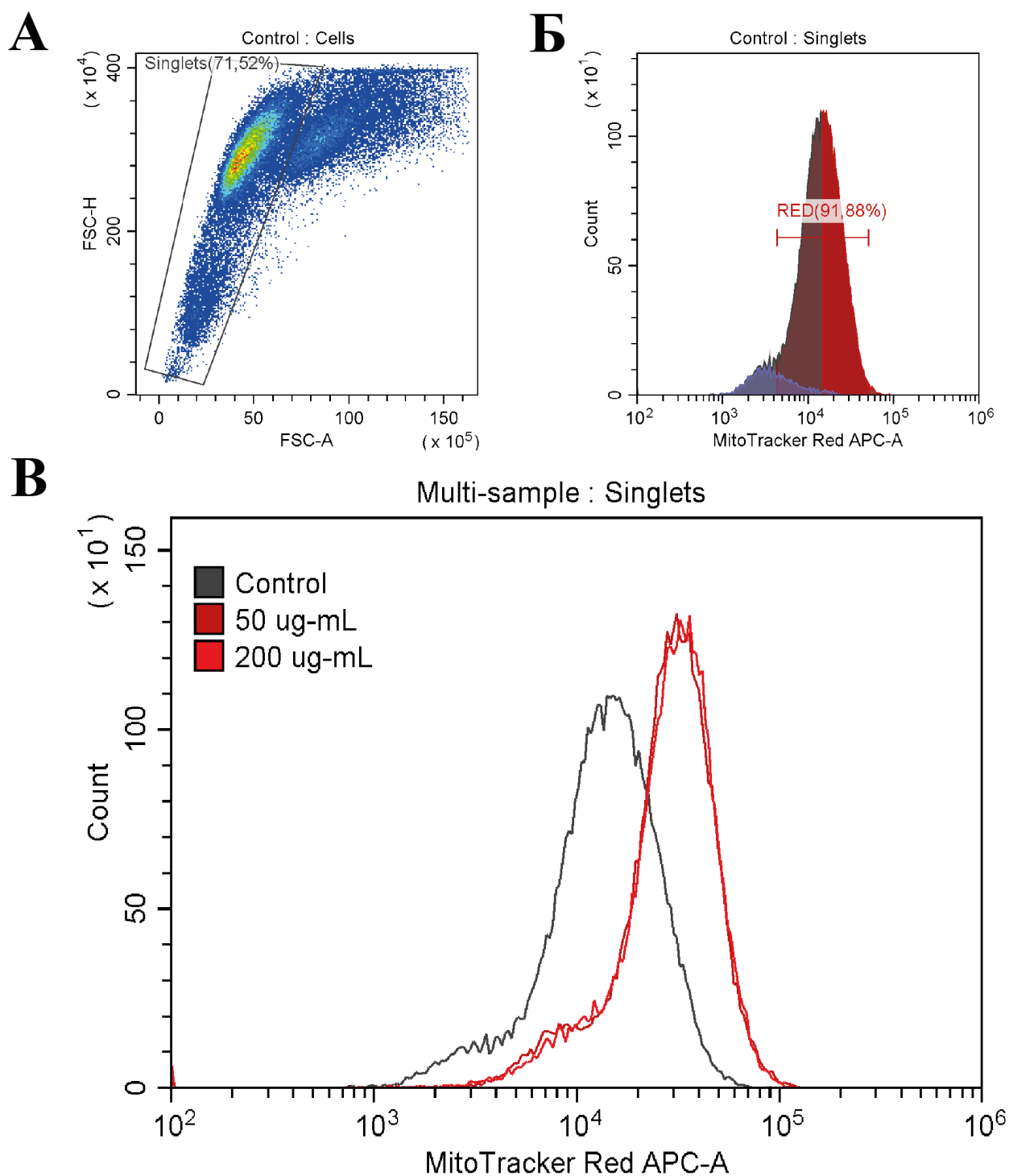


Рисунок 18 – Результаты анализа изменения митохондриального потенциала в клетках миоцитов C2C12. Окрашивание с MitoTracker™ Red CMXRos. А. Точечный график распределения популяции клеток при культивировании без добавления КК, количество одиночных клеток 72 %. Б. График распределения популяции клеток при культивировании без КК; в красном спектре (окрашенные MitoTracker™ Red CMXRos) 92 %, медиана 13734,2. В. Разница митохондриального потенциала в клетках контроля (культивирование без КК,

черная линия) и эксперимента (культивирование с КК в концентрации 50 и 200 мкг/мл, медиана 28840,2 и 29440,2, красные линии).

3.2.5. Вывод по анализу эффектов КК *in vitro*

Исследование цитотоксичности на пяти клеточных линиях показало, что некоторые клетки не снижают жизнеспособность в МТТ тесте (Vero, HPF), что может указывать на биосовместимость КК. При этом высокая концентрация КК (256 мкг/мл) индуцировала снижение жизнеспособности клеточных линий опухолевого происхождения (IMR-32, НСТ-116), что может свидетельствовать о ее антипролиферативных свойствах. Такие свойства проявляются у многих полисахаридов микробного происхождения (раздел 1.1.3). МТТ-тест на клеточной линии С2С12 также показал снижение жизнеспособности клеток при максимальной исследуемой концентрации КК (256 мкг/мл). Дополнительно на этом этапе был проведен анализ морфологии клеток, показавших изменение жизнеспособности. Для клеточной линии С2С12 были зафиксированы характерные признаки миогенной дифференцировки: клетки выстраивались в ряды и формировали отростки, ядра в клетках при этом выстраивались в линию. Изменений морфологии в клеточных линиях опухолевого происхождения зафиксировано не было.

Для более подробного описания влияния КК на клеточную линию миоцитов С2С12 был проведен ряд дополнительных экспериментов с использованием проточной цитометрии. В первую очередь, был проведен анализ клеточной гибели в культуре для уточнения выводов МТТ-теста о снижении жизнеспособности клеток при максимальной концентрации КК (256 мкг/мл). Добавление КК в концентрации 200 мкг/мл приводило к увеличению числа мёртвых клеток с 2,14 % до 11,36 %. Данный результат может быть связан как с цитотоксичностью КК для этой клеточной линии, так и быть следствием дифференцировки клеток, наблюдаемой при анализе изображений флуоресцентной микроскопии.

Для анализа функционирования митохондрий в клеточной линии миоцитов была проведена оценка уровня АФК путем окрашивания CM-H2DCFDA и

последующего измерения методом проточной цитометрии. Дополнительно было оценено количество активных митохондрий с красителем MitoTracker™ Red CMXRos, зависящего от мембранного потенциала митохондрий. Было зафиксировано, что добавление КК в концентрации 50 мкг/мл приводит к увеличению уровня АФК, а использование большей концентрации КК (200 мкг/мл) приводит к сокращению до уровня АФК в контроле. При дифференцировке в клеточной линии С2С12 может повышаться уровень АФК, однако его сокращение при максимальной концентрации КК может указывать на ее антиоксидантные свойства. Количество митохондрий с высоким мембранным потенциалом повышается в сравнении с контролем при использовании обеих концентраций КК, что также характерно для дифференцировки.

3.3. Исследование влияния КК на организм мышей

Материалы и результаты раздела опубликованы в статье [130].

3.3.1. Оценка субхронической токсичности КК

Поскольку в исследовании *in vitro* не было выявлено признаков высокой цитотоксичности КК, было проведено исследование субхронической токсичности КК *in vivo* на модели аутбредных мышей ICR(CD-1). В целом, 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.

Во всех экспериментальных группах, начиная с первого дня наблюдения, отмечали повышенное потребление воды и увеличенный аппетит, нормальную частоту и глубину дыхания, нормальную консистенцию фекалий и повышенную частоту мочеиспускания. Мыши проявляли повышенную физическую активность и проводили больше времени в играх и в беговом колесе (оценка влияния КК на

физическую активность проводилась в отдельном эксперименте, результаты которого представлены в разделе 3.3.3). Эти особенности поведения могут быть как следствием стимулирующего эффекта КК, так и следствием токсичности [116].

В исследовании на нематодах было также отмечено, что КК улучшает локомоторную активность и повышает выживаемость нематод [12]. Таким образом, мы можем предположить, что наблюдаемый эффект на поведении мышей связан именно с механизмом стимуляции, причем проявляется даже среди разных групп многоклеточных. Для подтверждения этого предположения было проведено исследование влияния КК на физическую активность животных в тесте вынужденного плавания (раздел 3.3.3).

Другим важным 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 (таблица 8). 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 поведение и высокий уровень физической активности.

Алопеция вызвана аутоиммунной патологией, ассоциированной со старением [136], стрессом [137], а также может быть индуцирована химическими веществами с высоким токсическим потенциалом [138]. Алопеция также является проявлением нарушения системного иммунитета. Наблюдения за изменением состояния шерсти и возникновения алопеции у мышей показывают, что КК обладает дозозависимым проявлением токсичности, при этом низкие дозы (0,1 мг/г) являются наименее токсичными. Кроме того, первые изменения состояния меха при употреблении высоких концентраций КК проявлялись только на 7 день наблюдения, что указывает на проявление токсичности КК только при длительном употреблении.

Таблица 8 – Изменения морфологии и поведения в экспериментальных группах

Наблюдение	Доза КК, мг на 1 г массы тела			
	0,1 мг/г	0,5 мг/г	0,75 мг/г	1 мг/г
Изменение состояния меха	-	С 15 дня	С 7 дня	С 7 дня
Алопеция	-	С 22 дня	С 18 дня	С 18 дня
Физическая активность	Повышение физической активности			

Масса тела животных измерялась 3 раза в неделю во все время наблюдения. Зависимость массы тела от употребления КК показана на рисунке 19 и в таблице 9. 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 (таблица 10). Однако при этом динамика изменения массы тела у животных, получавших КК, отличается от контрольной группы. В течение первых трех дней эксперимента в группах мышей, получавших дозу КК 1 мг/г, отмечалось снижение массы тела в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$) (таблица 9).

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 (таблица 9). 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 (таблица 9, рисунок 19 (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 (таблица 9, рисунок 19 (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, $p < 0,05$, таблица 9, 10)

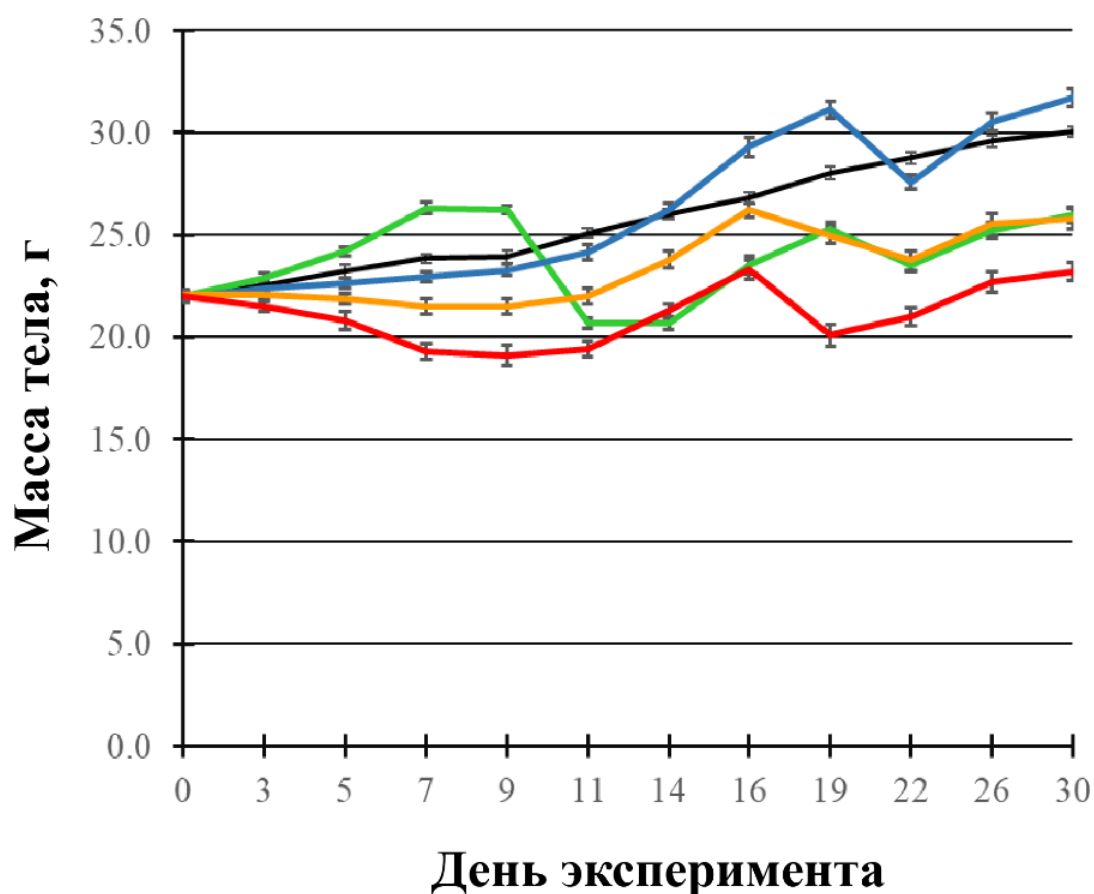


Рисунок 19 – Динамика изменения массы тела животных в исследовании субхронической токсичности. Цветом выделены группы (по 5 мышей в группе):

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.

Таблица 9 – Изменение массы тела животных (г) в течение 30 дней эксперимента с учетом стандартного отклонения. Мыши (n = 25) были разделены на группы по 5 особей в зависимости от дозы КК. Значимость различий между массой тела животных в контрольной и экспериментальной группе в один день эксперимента оценивалась с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение.

Сутки	Доза КК, мг/г				
	0	0,1	0,5	0,75	1
0	22,1 ± 0,3	22 ± 0,2 (p = 1)	22 ± 0,2 (p = 1)	22,1 ± 0,3 (p = 1)	22 ± 0,3 (p = 1)
3	22,6 ± 0,2	22,9 ± 0,3 (p = 0,555)	22,4 ± 0,2 (p = 1)	22,1 ± 0,2 (p = 0,063)	21,5 ± 0,2 (p = 0,048)
5	23,2 ± 0,3	24,2 ± 0,2 (p = 0,047)	22,6 ± 0,3 (p = 0,14)	21,9 ± 0,3 (p = 0,047)	20,8 ± 0,4 (p = 0,048)
7	23,8 ± 0,2	26,3 ± 0,3 (p = 0,047)	23 ± 0,3 (p = 0,047)	21,5 ± 0,4 (p = 0,048)	19,3 ± 0,4 (p = 0,048)
9	23,9 ± 0,3	26,2 ± 0,2 (p = 0,047)	23,3 ± 0,3 (p = 0,085)	21,5 ± 0,4 (p = 0,032)	19,1 ± 0,5 (p = 0,032)
11	25,1 ± 0,2	20,7 ± 0,2 (p = 0,046)	24,1 ± 0,4 (p = 0,046)	22 ± 0,4 (p = 0,046)	19,4 ± 0,4 (p = 0,047)
14	26 ± 0,3	20,7 ± 0,3 (p = 0,047)	26,2 ± 0,4 (p = 1)	23,8 ± 0,4 (p = 0,047)	21,3 ± 0,3 (p = 0,048)
16	26,8 ± 0,3	23,5 ± 0,4 (p = 0,047)	29,3 ± 0,5 (p = 0,048)	26,2 ± 0,3 (p = 0,145)	23,3 ± 0,5 (p = 0,032)

19	28 ± 0,3	25,3 ± 0,3 (p = 0,047)	31,1 ± 0,4 (p = 0,047)	25 ± 0,4 (p = 0,048)	20,1 ± 0,5 (p = 0,048)
22	28,8 ± 0,3	23,5 ± 0,3 (p = 0,032)	27,6 ± 0,3 (p = 0,032)	23,7 ± 0,5 (p = 0,032)	21 ± 0,4 (p = 0,032)
26	29,6 ± 0,3	25,2 ± 0,4 (p = 0,048)	30,5 ± 0,4 (p = 0,048)	25,5 ± 0,5 (p = 0,048)	22,7 ± 0,5 (p = 0,048)
30	30 ± 0,3	26 ± 0,4 (p = 0,032)	31,7 ± 0,4 (p = 0,048)	25,8 ± 0,5 (p = 0,032)	23,2 ± 0,4 (p = 0,048)

Таблица 10 – Общее увеличение массы тела по завершении 30-дневного исследования субхронической токсичности КК в группах по 5 мышей. Значимость различий между изменением массы тела в контрольной и экспериментальной группе оценивалась с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение.

Группа	Общее увеличение массы тела, г
0 мг/г	8 ± 0,3
0,1 мг/г	4 ± 0,4 (p = 0,047)
0,5 мг/г	9,8 ± 0,4 (p = 0,032)
0,75 мг/г	3,7 ± 0,5 (p = 0,032)
1 мг/г	1,2 ± 0,4 (p = 0,032)

В целом, изменение массы тела отражает влияние КК на организм мыши. 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, так наблюдалось повышенное употребление жидкости и учащенное мочеиспускание. Увеличение массы тела также может быть связано с изменением массы внутренних органов вследствие проявления токсического эффекта КК (раздел 3.3.2). Таким образом, на основе только наблюдения и измерения массы тела невозможно сделать

предварительный вывод о механизме влияния КК на организм мыши, за исключением явного умеренного токсического эффекта.

3.3.2. Изменение массы внутренних органов мышей при получении КК

По завершении 30 дней эксперимента мыши были усыплены инъекцией золетила и ксилазина. При проведении диссекции не было отмечено внешних признаков патологии или воспаления. Однако при взвешивании внутренних органов выяснилось, что сердце, почки и печень значительно различаются между группами. Средние значения масс органов с учетом стандартного отклонения представлены в таблицах 11–13 и на рисунках 20–22.

Значимых отличий массы сердца в контрольной и экспериментальной группах не выявлено. Однако при оценке массы сердца важно учитывать массу тела, поэтому для всех животных была рассчитана относительная масса органа. Было выявлено, что во всех группах относительная масса сердца увеличивается с увеличением дозы КК, статистически значимое увеличение 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.

Увеличение массы сердца является типичным признаком токсического эффекта [139] и может быть ассоциировано с увеличением частоты сердцебиения и, как следствие, увеличением механической нагрузки на перегородку, а также с увеличением количества жировой ткани. В то же время, увеличение массы сердца может быть связано с ростом кардиомиоцитов (как в случае применения анаболических стероидов) [140]. Поскольку животные получали КК на протяжении 30 дней и изменение массы органа проявляется дозозависимо, наблюдаемые изменения, скорее всего, являются компенсаторными.

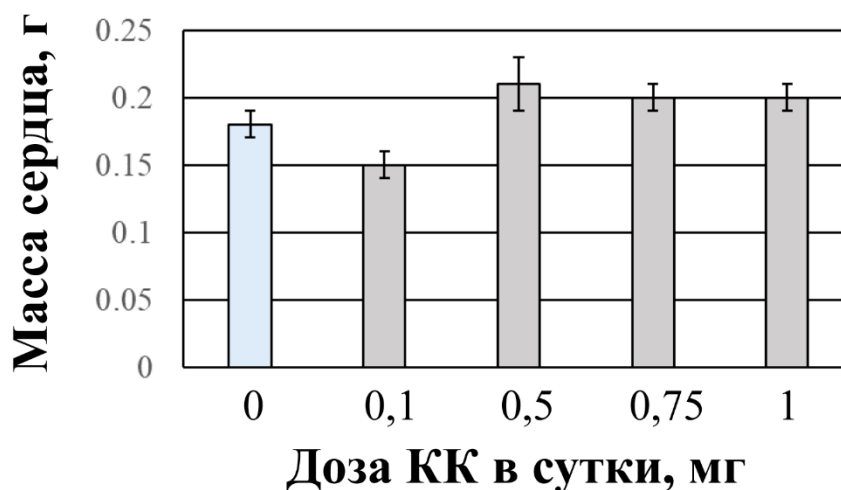


Рисунок 20 – Масса сердца после 30 дней получения КК в экспериментальных группах (серый цвет) в сравнении с контрольной группой (голубой цвет), количество животных в группе $n = 5$. Дозы КК указаны в мг из расчета на 1 г массы тела животного. Указано среднее значение и стандартное отклонение.

Таблица 11 – 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 ($p = 0,044$)

Для анализа токсичности необходимо изучить печень, особенно при пероральном применении КК для оценки субхронической токсичности. Согласно результатам взвешивания, масса печени статистически значимо увеличена во всех экспериментальных группах (рисунок 21, таблица 12). При анализе относительной массы печени также отмечено увеличение массы органа 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.

Дозозависимое увеличение массы печени указывает на токсигенный потенциал КК или недостаточную степень ее очистки, однако отсутствие этого эффекта при минимальной дозировке дает возможность проведения дальнейших исследований. Кроме того, патологии более удаленных от кишечника органов (сердце, почки, кожа) указывает на невозможность полной инактивации препарата КК в печени. Масса печени зависит от объема находящейся в ней крови, накопления жира и гликогена. Увеличение печени может быть связано как с ее дистрофией (замещение гепатоцитов жировой тканью), гипертрофией (увеличение объема гепатоцитов), гиперплазией или неоплазией (усиление пролиферации клеток) [139].

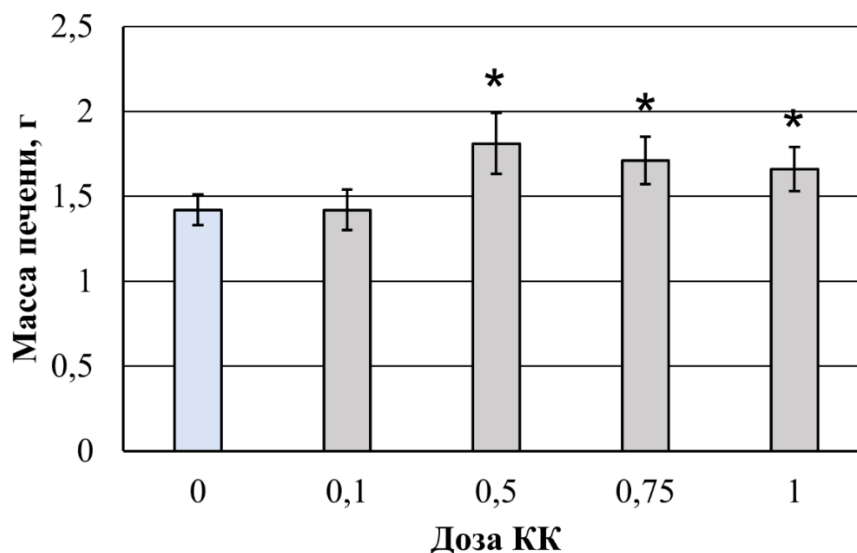


Рисунок 21 – Масса печени после 30 дней получения КК в экспериментальных группах (серый цвет) в сравнении с контрольной группой (голубой цвет), количество животных в группе $n = 5$. Дозы КК указаны в мг из расчета на 1 г массы тела животного. Указано среднее значение и стандартное отклонение. Символом (*) отмечены статистически значимые различия (критерий Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение, $p < 0,05$).

Таблица 12 – 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)

Выделительная система также является маркером токсигенного эффекта веществ и стандартно анализируется в токсикологии. Почки особенно чувствительны к токсинам, так как взаимодействуют с большими относительно массы органа объемами крови. Согласно результатам взвешивания почек, их масса значительно снижалась в группах, получавших максимальные дозы КК (0,75 и 1 мг/г) (рисунок 22, таблица 13). 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. Это наблюдение подтверждает дозозависимый токсический эффект КК.

Уменьшение массы почек обычно связывают с дегенерацией клеток, некрозом и апоптозом под действием токсичных соединений [139]. Поскольку мы наблюдали изменения масс других органов и алопеции во всех группах, кроме получавших минимальную дозу (0,1 мг/г), мы можем предположить, что уменьшение массы почек связано с аутоиммунным процессом или нарушением микроциркуляции крови.

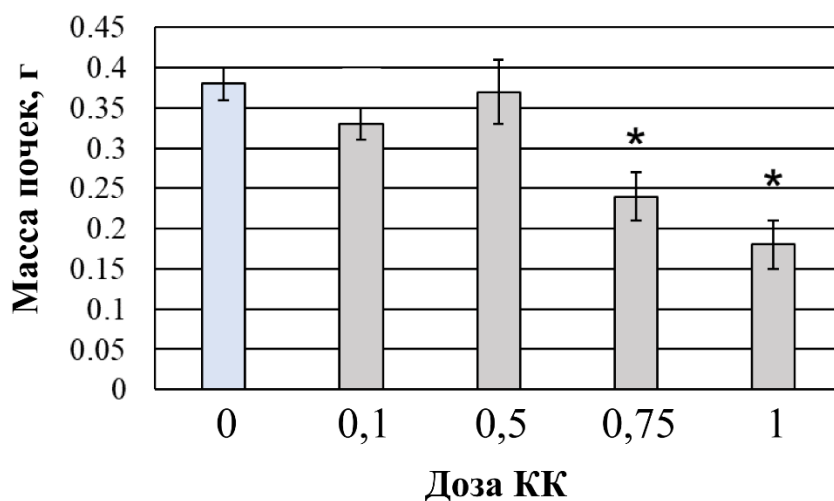


Рисунок 22 – Масса почек после 30 дней получения КК в экспериментальных группах (серый цвет) в сравнении с контрольной группой (голубой цвет), количество животных в группе $n = 5$. Дозы КК указаны в мг из расчета на 1 г массы тела животного. Указано среднее значение и стандартное отклонение. Символом (*) отмечены статистически значимые различия (критерий Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение, $p < 0,05$).

Таблица 13 – 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

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 [120] с тремя этапами [121] (рисунок 23, таблицы 14–15). 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 $128,8 \pm 8,6$ соответственно, $p < 0,05$), что показывает увеличенную силу животных.

Соотношение времени последнего и первого заплыва использовалось как показатель выносливости животных при длительной нагрузке. В соответствии с рекомендациями [121], 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 $0,38 \pm 0,08$, $p < 0,05$). Снижение может быть связано с токсическим эффектом препарата КК.

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. Увеличение времени плавания на первом этапе может быть связано с особенностями строения и функционирования митохондрий [141,142].

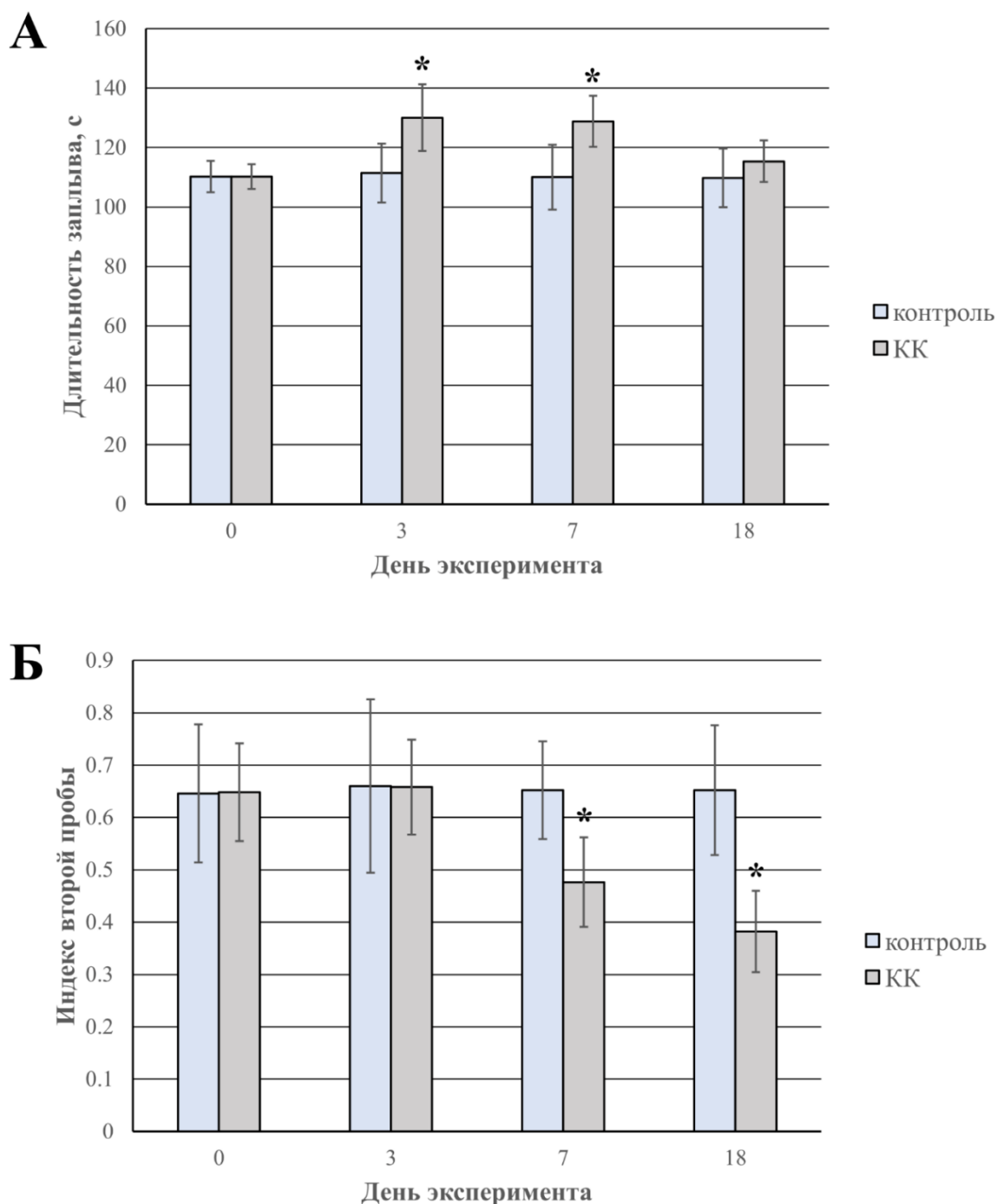


Рисунок 23 – Результаты теста вынужденного плавания с нагрузкой (5 % от массы тела). Контрольная группа (синий цвет, $n = 15$) получала обычную питьевую воду. Экспериментальная группа (красный, $n = 15$) получала КК 1 мг/г, растворенную в питьевой воде. На верхнем графике (А) отражено среднее время первого заплыва (в секундах) в начале эксперимента и на 3, 7 и 18 день, на нижнем (Б) – индекс второй пробы. Указано стандартное отклонение и статистически значимые различия (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$)

Таблица 14 – Результаты теста вынужденного плавания, продолжительность первого заплыва по дням. Указаны средние значения и стандартное отклонение, оценка значимости различий в сравнении с контролем в тот же день проведения эксперимента указана в скобках, значимость оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента.

Группа	День	Средняя продолжительность первого заплыва, с
Контроль (n = 15)	0	110,2 ± 5,3
	3	111,4 ± 9,9
	7	110 ± 10,9
	18	109,8 ± 9,8
Мыши, получавшие КК (1 мг/г, n = 15)	0	110,2 ± 4,1 (p = 0,925)
	3	130 ± 11,2 (p = 0,024)
	7	128,8 ± 8,6 (p = 0,018)
	18	115,4 ± 7 (p = 0,16)

Таблица 15 – Результаты теста вынужденного плавания (индекс второй пробы). Указаны средние значения и стандартное отклонение, оценка значимости различий в сравнении с контролем в тот же день проведения эксперимента указана в скобках, значимость оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента.

Группа	День	Индекс второй пробы
Контроль (n = 15)	0	0,65 ± 0,13
	3	0,66 ± 0,17
	7	0,65 ± 0,1
	18	0,65 ± 0,12
Мыши, получавшие	0	0,65 ± 0,09 (p = 0,98)
	3	0,66 ± 0,1 (p = 0,98)

КК (1 мг/г, n = 15))	7	0,48 ± 0,09 (p = 0,015)
	18	0,38 ± 0,08 (p = 0,005)

3.3.4. Влияние КК на ультраструктуру миокарда желудочков сердца мыши

Поскольку на клеточных линиях были обнаружены изменения в морфологии и метаболизме миоцитов, отдельной задачей стало исследование расположения митохондрий в кардиомиоцитах мышей, получавших КК. Ультраструктурный анализ кардиомиоцитов выявил, что в экспериментальной группе по сравнению с контрольной отмечается менее темная линия оболочки митохондрий, что может быть связано с процессом слияния органелл. Кроме того, 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 (рисунки 24–25, таблицы 16–17). При этом для обеих групп отмечается нормальная исчерченность и расположение межклеточных контактов кардиомиоцитов, отсутствуют различия в морфологии митохондрий (таблица 13).

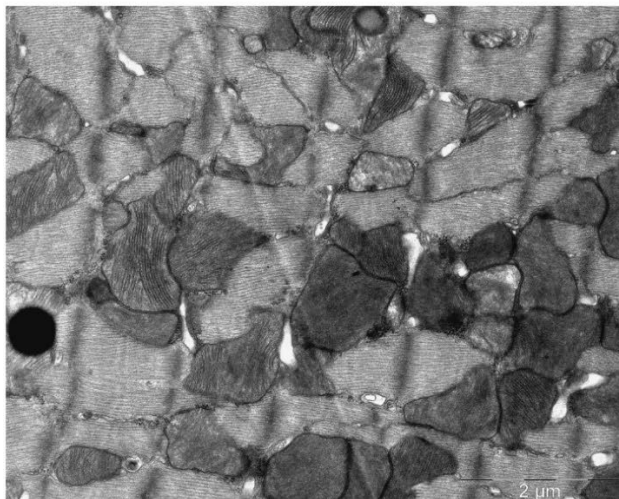
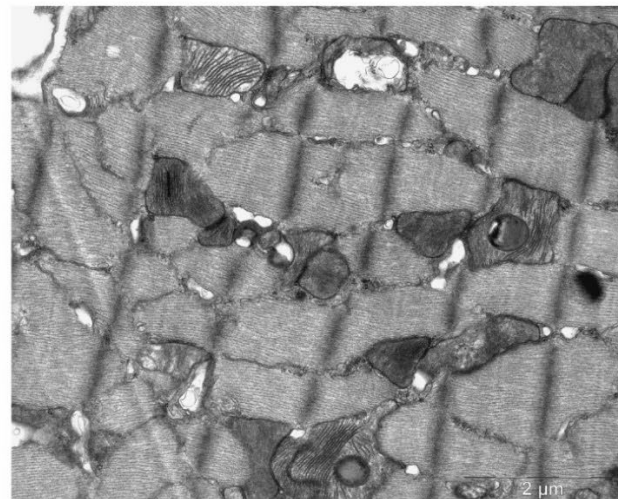
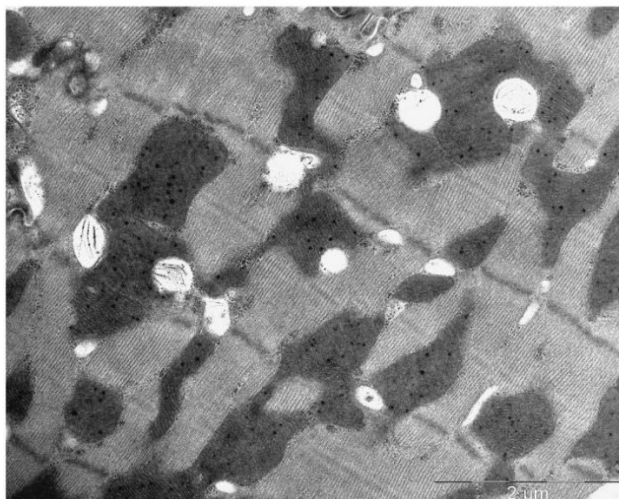
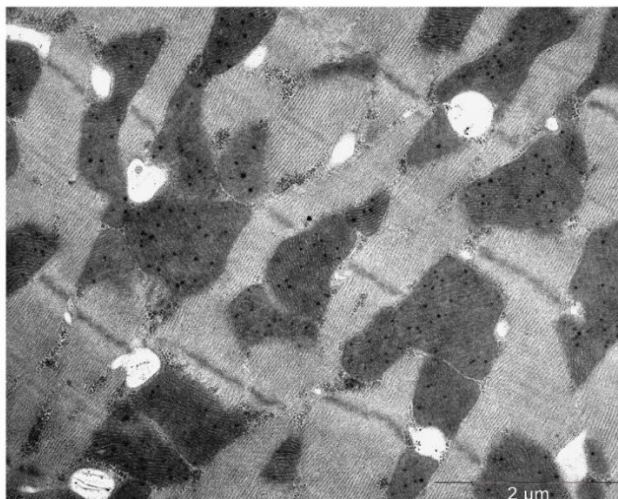
А**Б****В****Г**

Рисунок 24 – Снимки ТЭМ желудочков сердца мышей из контрольной группы (А, Б) и получавших КК (В, Г).

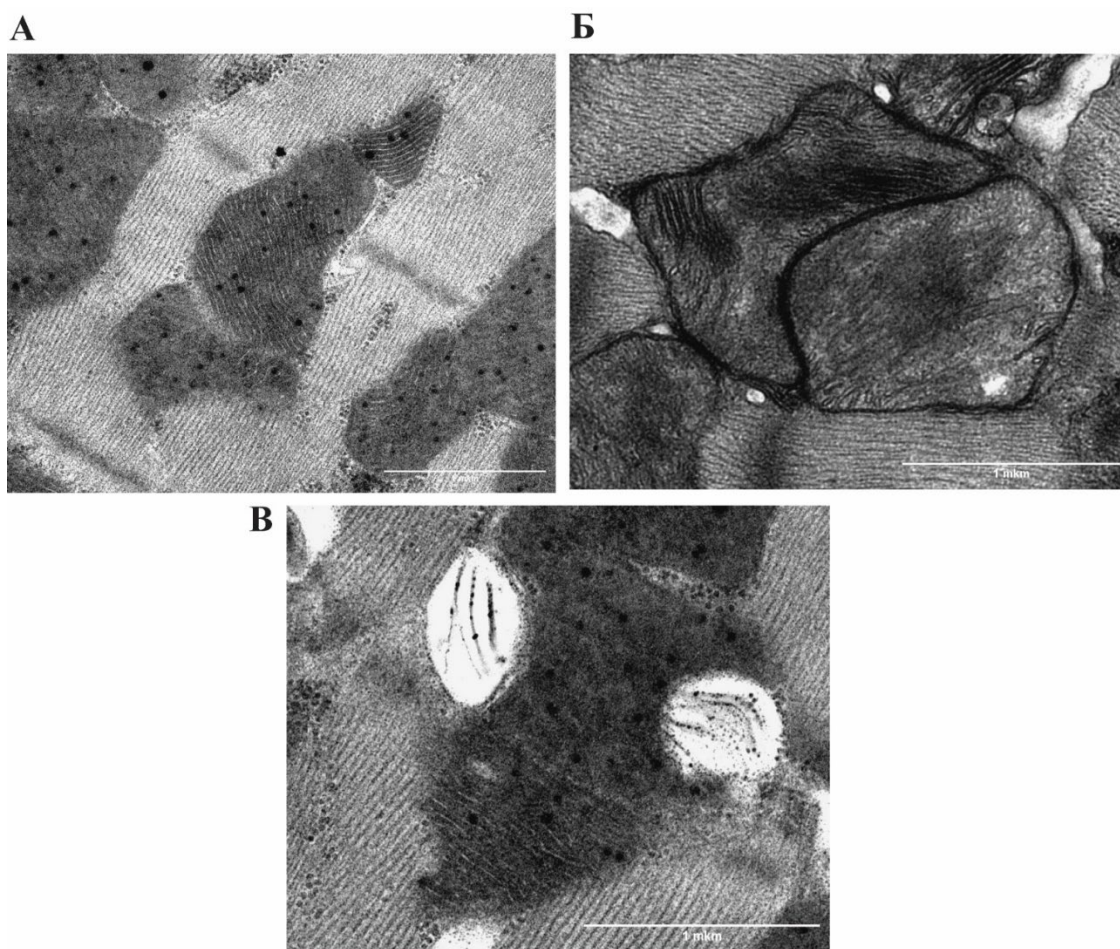


Рисунок 25 – Особенности ультраструктуры миокарда мышцы: более проницаемая для электронов оболочка митохондрий в клетках миокарда животных, получавших КК (А) в сравнении с контролем (Б), митофагия (В).

Таблица 16 – Особенности морфологии митохондрий в тканях желудочков сердца мышей.

	Площадь, мкм ²	Периметр, мкм	Длина, мкм	Ширина, мкм
Контроль	0,46 ± 0,23	2,84 ± 0,72	1 ± 0,28	0,53 ± 0,21
Мыши, получавшие КК	0,43 ± 0,24	2,89 ± 1	0,91 ± 0,3	0,57 ± 0,26
р-значение	0,73	0,44	0,52	0,36

Таблица 17 – Особенности морфологии везикул (лизосомы, фагосомы) в тканях желудочков сердца мышей.

	Площадь, мкм ²	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

3.3.5. Выводы о влиянии КК на организм мышей

Анализ субхронической токсичности КК в дозах 0,1, 0,5, 0,75 и 1 мг на 1 г массы животного выявил дозозависимое повышение токсичности: патологических изменений не наблюдается при ежедневном употреблении мышами 0,1 мг/г КК, однако при повышении дозы внешние признаки токсичности проявляются с 18–22 дня наблюдений. В течение эксперимента масса тела животных изменялась, однако в большинстве случаев на момент завершения эксперимента масса тела животных в экспериментальной группе была ниже, чем в контрольной.

По завершении эксперимента был проведен анализ изменения массы сердца, печени и почек. Увеличение массы сердца и печени было зафиксировано для всех доз, кроме минимальной, при этом уменьшение массы почек было зафиксировано для всех доз, кроме 0,5 мг/г. Эти наблюдения являются типичным признаком хронической токсичности вещества, однако являются дозозависимыми и не приводят к гибели животных.

В исследовании субхронической токсичности наблюдалось увеличение физической активности животных, игр, бега в колесе. В связи с этим был проведен эксперимент по влиянию КК на физическую активность в модифицированном тесте вынужденного плавания. Для снижения токсического эффекта исследование проводилось 18 дней (срок появления первых внешних признаков токсичности по результатам исследования субхронической токсичности). Выявлено, что КК действительно увеличивает физическую активность и силу животных в первые 7 дней эксперимента, что отражается в увеличенном времени первого заплыва, однако к концу эксперимента этот эффект исчезает. Соотношение времени

последнего и первого заплыва (показатель, отражающий выносливость животных) в течение исследования сокращался у животных, получавших КК. Таким образом, выявлено, что КК обладает в целом стимулирующим эффектом, однако этот эффект ограничен во времени. Снижение влияния КК на физическую активность может быть связано со слабым токсическим эффектом, описанном в исследовании субхронической токсичности. Такие наблюдения соотносятся с ранее описанным влиянием КК на поведение нематод, в том числе увеличения их моторной активности даже при старении [13].

Для описания эффектов КК на уровне клеток в модели животных была выполнена ПЭМ миокарда желудочков сердца мыши. В клетках миокарда животных, получавших КК, отмечали менее темную границу митохондрий, а также большее количество и площадь вакуолей, в том числе содержащих фрагменты митохондрий внутри – проявление митофагии. Известно, что бактериальные ЛПС могут индуцировать митофагию как результат воспалительного процесса путем регуляции активности белков PINK1-Parkin [134,135]. В этом случае митофагию следует рассматривать как защитный механизм [134]. Однако именно для кардиомиоцитов митофагия считается важным процессом для поддержания функционирования мышечной ткани, а снижение митофагии является предшественником заболеваний сердца, ассоциированных с возрастом [136]. Поиск и исследование соединений, влияющих на динамику митохондрий в кардиомиоцитах, является перспективным направлением биомедицины. КК является одним из первых описанных бактериальных полисахаридов, имеющих такой эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

КК была впервые описана в 1963 году [11], однако долгое время рассматривалась лишь как один из компонентов бактериальной оболочки и матрикса биопленки. В 2017 году было опубликовано исследование, в котором при скрининге библиотеки делеционных штаммов Кейо обнаружилась способность продуцентов КК увеличивать продолжительность жизни нематод и дрозофил, а также защищать от проявлений заболеваний, ассоциированных со старением [12]. Авторы связали этот эффект с влиянием бактериального полисахарида на динамику деления митохондрий и регуляцию митохондриального ответа на неправильно свернутые белки. В дальнейшем авторы показали также возможность продукции КК в кишечнике нематод [13].

Основной результат представленного диссертационного исследования – описание эффектов КК в моделях клеточных линий и мышей. В экспериментах *in vitro* установлено, что КК не оказывает значительного влияния на жизнеспособность клеток различного происхождения, может индуцировать морфологические изменения клеток линии C2C12, характерные для дифференцировки по миогенному пути, влияет на мембранный потенциал митохондрий и генерацию АФК. В экспериментах *in vivo* получение КК животными не привело к их гибели, однако было связано с изменением массы тела и внутренних органов, изменениями в поведении и физической активности, а также изменении ультраструктуры миокарда и индукции митофагии.

Одной из сложностей в исследовании полисахаридов является их очистка от примесей других полисахаридов, ЛПС, ДНК, белков. Протоколы, описанные в ранее опубликованных исследованиях, потенциально могут привести к присутствию этих примесей в образце, поэтому первой задачей данного исследования стала оптимизация протокола выделения КК. Было разработано пять вариаций протокола с учетом различий в условиях культивирования, осадителей, количества этапов. Состав образцов оценивался методом ГХ-МС. Выбранный протокол №5 позволяет получить 213,8 мг вещества из 1 литра бактериальной

культуры, при этом образец не содержит маннозы, которая может являться компонентом других полисахаридов (маннан, О-антиген).

Оценка влияния КК на жизнеспособность клеточных линий проводилась в МТТ-тесте. Слабый ингибирующий эффект был обнаружен для клеточных линий опухолевого происхождения (HCT-116, IMR-32) и линии миоцитов мыши (C2C12). КК не влияет на жизнеспособность линий фибробластов человека (HPF) и почечного эпителия мартышки (Vero). Так как ингибирующий эффект наблюдался только в максимальной исследуемой концентрации (256 мкг/мл), эти результаты указывают на низкую цитотоксичность КК.

Для трех клеточных линий, показавших изменение жизнеспособности при добавлении КК, было проведено исследование изменения морфологии клеток методом флуоресцентной микроскопии. Для клеточной линии C2C12 были зафиксированы морфологические изменения, характерные для миогенной дифференцировки. Для клеточных линий опухолевого происхождения (IMR-32, HCT-116) изменений морфологии зафиксировано не было. В дальнейшем для линии миоцитов C2C12 было продемонстрировано увеличение клеточной гибели, что также может быть следствием дифференцировки и дополняет результаты, полученные в МТТ-тесте.

Так как ранее было описано влияние КК на процесс деления митохондрий [12], было проведено исследование влияния полисахарида на основные показатели функционирования митохондрии в клеточной линии миоцитов мыши. Было обнаружено, что добавление КК в питательную среду приводит к повышению мембранного потенциала митохондрий, однако при этом при добавлении максимальной исследованной концентрации КК (200 мкг/мл) количество АФК снижается до уровня контроля без КК. Так как при дифференцировке клеток C2C12 происходит увеличение содержания АФК, то это указывает на возможное наличие слабых антиоксидантных свойств у КК.

В исследовании субхронической токсичности КК были выявлены побочные эффекты КК, выражавшиеся в ухудшении состояния шерсти, нестабильном изменении массы тела и изменением относительных масс внутренних органов

(сердца, печени, почек). Однако при этом животные не погибли до завершения эксперимента и проявляли повышенную физическую активность. Для оценки стимулирующего эффекта КК было проведено исследование влияния КК на результаты теста вынужденного плавания в модификации для оценки и физической активности в аэробной нагрузке, и выносливости. Результаты показали, что КК действительно способна значимо увеличивать физическую активность животных, однако к концу эксперимента этот эффект пропадает вместе со снижением выносливости, что может быть связано с развивающимися на фоне слабой токсичности патологиями. Дополнительно была проведена оценка изменения ультраструктуры миокарда мышей, в результате которой была выявлена индукция митофагии в клетках. Такой результат, с одной стороны, указывает на относительную безопасность полисахарида и демонстрирует ранее не описанный стимулирующий эффект, с другой стороны, ставит вопросы о механизме влияния КК на клетки и митохондрии и необходимости разработки протокола с большей степенью очистки при дальнейших исследованиях (например, с использованием хроматографической очистки).

Описанные в работе эффекты КК в моделях *in vitro* и *in vivo* демонстрируют ее высокую биологическую активность. К наиболее важным наблюдениям на клеточных линиях можно отнести проявления возможной антипролиферативной активности в отношении клеток опухолевого происхождения и способность индуцировать миогенную дифференцировку в клеточной линии миоцитов, проявляя при этом слабые антиоксидантные свойства. В модели мышей отмечается слабая субхроническая токсичность, сопровождающаяся временным увеличением физической активности и изменением ультраструктуры кардиомиоцитов, в том числе индукции митофагии. Возможно, дополнительный этап очистки в дальнейших исследованиях (например, с использованием гель-фильтрационной хроматографии) позволит сократить проявление токсичности. В диссертационной работе проведен разносторонний анализ биологических эффектов КК, в дальнейших исследованиях эти результаты могут быть учтены для более детального описания механизма действия КК.

Результаты диссертации опубликованы в 4 научных статьях в изданиях, индексируемых в базах РИНЦ, Scopus и Web of Science, а также в 6 сборниках по результатам участия в конференциях.

ВЫВОДЫ

1. Оптимальный протокол получения КК из бактериальной культуры сверхпродуцента *E. coli* S17-3 pBhya-SAB должен включать этапы культивирования при рН 4,5, инактивирования бактериальных клеток антибиотиками и их удаления 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, HCT-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 мыши C2C12 до 70 %.
3. КК в концентрации 200 мкг/мл индуцирует морфологические изменения клеточной линии C2C12, характерные для миогенной дифференцировки клеток. Добавление КК в культуры клеток опухолевого происхождения (IMR-32, HCT-116) не приводит к изменению морфологии клеток.
4. При концентрации КК 200 мкг/мл наблюдается увеличение клеточной гибели клеток линии C2C12 (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 $0,123 \pm 0,08$ мкм² в сравнении с контролем $0,045 \pm 0,07$ мкм², при этом отмечается появление признаков митофагии.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- КК – колановая кислота
- ГХ-МС - газовая хроматография-масс-спектрометрия
- ЭПС - экзополисахарид
- ЛПС - липополисахарид
- ТХУ – трихлоруксусная кислота
- МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ДМСО - диметилсульфоксид
- PI – пропидий иодид
- CM-H2DCFDA - 5-(и-6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат
- АФК – активные формы кислорода
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
- SCID – severe combined immunodeficiency, тяжелый комбинированный иммунодефицит
- ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Вахитов Т.Я. Филометаболическое ядро микробиоты кишечника // Альманах клинической медицины. 2015. № 40. С. 12–34.
2. Tsvetikova S.A., Koshel E.I. Microbiota and cancer: host cellular mechanisms activated by gut microbial metabolites // International Journal of Medical Microbiology. 2020. Т. 310, № 4.
3. Mohammed A.S.A., Naveed M., Jost N. Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities) // J Polym Environ. Springer, 2021. Т. 29. С. 2359–2371.
4. Khan T. и др. Polysaccharides as potential anticancer agents - A review of their progress // Carbohydr Polym. Elsevier, 2019. Т. 210. С. 412–428.
5. Wang J. и др. Reviews on Mechanisms of in Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Publishing Corporation, 2016. Т. 2016.
6. Tzianabos A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function // Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology (ASM), 2000. Т. 13, № 4. С. 523–533.
7. Khan R. и др. Bacterial polysaccharides - A big source for prebiotics and therapeutics // Front Nutr. Frontiers Media SA, 2022. Т. 9. С. 1031935.
8. Guo R. и др. Polysaccharides as potential anti-tumor biomacromolecules - a review // Front Nutr. Frontiers Media SA, 2022. Т. 9. С. 838179.
9. Troy E.B., Kasper D.L. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system // Front Biosci. NIH Public Access, 2010. Т. 15. С. 25.
10. Portela R. и др. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications // Microb Biotechnol. Wiley Online Library, 2019. Т. 12, № 4. С. 586–610.
11. Goebel W.F. Colanic acid // Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences, 1963. Т. 49, № 4. С. 464–471.

12. Han B. и др. Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity // Cell. Elsevier, 2017. Т. 169, № 7. С. 1249-1262.e13.
13. Hartsough L.A. и др. Optogenetic control of gut bacterial metabolism to promote longevity // Elife. eLife Sciences Publications, Ltd, 2020. Т. 9. С. e56849.
14. Firozi P. и др. Identification and removal of colanic acid from plasmid DNA preparations: Implications for gene therapy // Gene Ther. Nature Publishing Group, 2010. Т. 17, № 12. С. 1484–1499.
15. Sapelli R. V., Goebel W.F. The capsular polysaccharide of a mucoid variant of *E. coli* K-12 // Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences, 1964. Т. 52, № 2. С. 265–271.
16. Prigent-Combaret C. и др. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: Role of flagella, curli and colanic acid // Environ Microbiol. 2000. Т. 2, № 4. С. 450–464.
17. Hanna A. и др. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* // Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology (ASM), 2003. Т. 69, № 8. С. 4474–4481.
18. Mao Y., Doyle M.P., Chen J. Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids // Lett Appl Microbiol. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Т. 42, № 6. С. 642–647.
19. Baumgartner M. и др. Mucosal biofilms are an endoscopic feature of irritable bowel syndrome and ulcerative colitis // Gastroenterology. Elsevier, 2021. Т. 161, № 4. С. 1245–1256.
20. Allen P.M. и др. The role of capsular polysaccharide K21b of *Klebsiella* and of the structurally related colanic-acid polysaccharide of *Escherichia coli* in resistance to phagocytosis and serum killing // J Med Microbiol. J Med Microbiol, 1987. Т. 24, № 4. С. 363–370.
21. Widmer G., Creasey H.N. Fecal microbiota impacts development of *Cryptosporidium parvum* in the mouse // Sci Rep. Nature Publishing Group UK London, 2024. Т. 14, № 1. С. 5498.

22. Navasa N. и др. Temperature has reciprocal effects on colanic acid and polysialic acid biosynthesis in *E. coli* K92 // *Appl Microbiol Biotechnol.* Springer-Verlag, 2009. Т. 82, № 4. С. 721–729.
23. Li D., Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases // *Signal Transduct Target Ther.* Nature Publishing Group UK London, 2021. Т. 6, № 1. С. 291.
24. Cummings R.D. The Mannose Receptor Ligands and the Macrophage Glycome // *Curr Opin Struct Biol.* NIH Public Access, 2022. Т. 75. С. 102394.
25. Cash H.L. и др. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, 2006. Т. 313, № 5790. С. 1126–1130.
26. van der Zande H.J.P. и др. The Mannose Receptor: From Endocytic Receptor and Biomarker to Regulator of (Meta)Inflammation // *Front Immunol.* Frontiers Media SA, 2021. Т. 12.
27. Rahabi M. и др. Divergent Roles for Macrophage C-type Lectin Receptors, Dectin-1 and Mannose Receptors, in the Intestinal Inflammatory Response // *Cell Rep.* Cell Rep, 2020. Т. 30, № 13. С. 4386-4398.e5.
28. Zamze S. и др. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor // *J Biol Chem.* J Biol Chem, 2002. Т. 277, № 44. С. 41613–41623.
29. Weis W.I., Taylor M.E., Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system // *Immunol Rev.* Immunol Rev, 1998. Т. 163. С. 19–34.
30. Sutherland I.W. Structural studies on colanic acid, the common exopolysaccharide found in the enterobacteriaceae, by partial acid hydrolysis. Oligosaccharides from colanic acid. // *Biochem J.* 1969. Т. 115, № 5. С. 935–945.
31. Zhang X. и др. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models // *Carbohydr Polym.* Elsevier, 2016. Т. 149. С. 186–206.

32. Wang Q. и др. A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2 // *J Exp Med*. The Rockefeller University Press, 2006. Т. 203, № 13. С. 2853.
33. Aslam S.N. и др. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation // *Current Biology*. Elsevier, 2008. Т. 18, № 14. С. 1078–1083.
34. Neff C.P. и др. Diverse intestinal bacteria contain putative zwitterionic capsular polysaccharides with anti-inflammatory properties // *Cell Host Microbe*. Elsevier, 2016. Т. 20, № 4. С. 535–547.
35. Stephen T.L., Groneck L., Kalka-Moll W.M. The modulation of adaptive immune responses by bacterial zwitterionic polysaccharides // *Int J Microbiol*. Hindawi, 2010. Т. 2010.
36. Avci F.Y., Kasper D.L. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system // *Annu Rev Immunol*. Annual Reviews, 2009. Т. 28. С. 107–130.
37. Guthrie L.A. и др. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. // *J Exp Med*. 1984. Т. 160, № 6. С. 1656–1671.
38. Park J. и др. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways // *Neurosci Lett*. Elsevier, 2015. Т. 584. С. 191–196.
39. Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis // *J Immunol Methods*. Elsevier, 2002. Т. 265, № 1–2. С. 49–72.
40. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, 1998. Т. 281, № 5381. С. 1309–1312.
41. Roy Chowdhury S. и др. Bacterial fucose-rich polysaccharide stabilizes MAPK-mediated Nrf2/Keap1 signaling by directly scavenging reactive oxygen species during hydrogen peroxide-induced apoptosis of human lung fibroblast cells // *PLoS One*. Public Library of Science San Francisco, USA, 2014. Т. 9, № 11. С. e113663.

42. Ramamoorthy S. и др. Structural characterization and anticancer activity of extracellular polysaccharides from ascidian symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis* // *Carbohydr Polym.* Elsevier, 2018. Т. 190. С. 113–120.
43. Itoh K., Tong K.I., Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2–Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles // *Free Radic Biol Med.* Elsevier, 2004. Т. 36, № 10. С. 1208–1213.
44. Chowdhury S.R. и др. Low fucose containing bacterial polysaccharide facilitate mitochondria-dependent ROS-induced apoptosis of human lung epithelial carcinoma via controlled regulation of MAPKs-mediated Nrf2/Keap1 homeostasis signaling // *Mol Carcinog.* Wiley Online Library, 2015. Т. 54, № 12. С. 1636–1655.
45. He F. и др. Components and Antioxidant Activity of the Polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03 // *Zeitschrift für Naturforschung C.* Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 2008. Т. 63, № 3–4. С. 181–188.
46. Wang C. и др. Isolation, characterization, and pharmaceutical applications of an exopolysaccharide from *Aerococcus uriaeequi* // *Mar Drugs.* MDPI, 2018. Т. 16, № 9. С. 337.
47. Priyanka P. и др. Prospecting exopolysaccharides produced by selected bacteria associated with marine organisms for biotechnological applications // *Chinese Journal of Polymer Science.* Springer, 2015. Т. 33. С. 236–244.
48. El-Newary S.A. и др. Production, characterization and biological activities of acidic exopolysaccharide from marine *Bacillus amyloliquefaciens* 3MS 2017 // *Asian Pac J Trop Med.* Elsevier, 2017. Т. 10, № 7. С. 652–662.
49. Kuzmich A.S., Romanenko L.A., Kokoulin M.S. Cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis induction in T-47D cells by the capsular polysaccharide from the marine bacterium *Kangiella japonica* KMM 3897 // *Carbohydr Polym.* Elsevier, 2023. Т. 320. С. 121237.
50. Kokoulin M.S. и др. Structure and *in vitro* bioactivity against cancer cells of the capsular polysaccharide from the marine bacterium *Psychrobacter marincola* // *Mar Drugs.* MDPI, 2020. Т. 18, № 5. С. 268.

51. Di Guida R. и др. Capsular polysaccharide from a fish-gut bacterium induces/promotes apoptosis of colon cancer cells *in vitro* through Caspases' pathway activation // Carbohydr Polym. Elsevier, 2022. Т. 278. С. 118908.
52. Lawson C.J. и др. Structural analysis of colanic acid from *Escherichia coli* by using methylation and base-catalysed fragmentation. Comparison with polysaccharides from other bacterial sources. // Biochem J. Portland Press Ltd, 1969. Т. 115, № 5. С. 947–958.
53. Wu H. и др. Activation of colanic acid biosynthesis linked to heterologous expression of the polyhydroxybutyrate pathway in *Escherichia coli* // Int J Biol Macromol. Elsevier, 2019. Т. 128. С. 752–760.
54. Wu J. и др. Engineering *Escherichia coli* to Efficiently Produce Colanic Acid with Low Molecular Mass and Viscosity // J Agric Food Chem. ACS Publications, 2024. Т. 72, № 28. С. 15811–15822.
55. Li S. и др. Combinatorial metabolic engineering and enzymatic catalysis enable efficient production of colanic acid // Microorganisms. MDPI, 2022. Т. 10, № 5. С. 877.
56. Garegg P.J. и др. Comparative structural studies on the M-antigen from *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Aerobacter cloacae*. // Acta Chem Scand. 1971. Т. 25, № 6. С. 2103–2108.
57. Grant W.D., Sutherland I.W., Wilkinson J.F. Exopolysaccharide colanic acid and its occurrence in the *Enterobacteriaceae*. // J Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM), 1969. Т. 100, № 3. С. 1187–1193.
58. Nassrf X. и др. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae* // Mol Microbiol. 1989. Т. 3, № 10. С. 1349–1359.
59. Allen P., Hart C.A., Saunders J.R. Isolation from *Klebsiella* and characterization of two *rcs* genes that activate colanic acid capsular biosynthesis in *Escherichia coli* // J Gen Microbiol. J Gen Microbiol, 1987. Т. 133, № 2. С. 331–340.

60. Ophir T., Gutnick D.L. A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation // *Appl Environ Microbiol.* American Society for Microbiology (ASM), 1994. Т. 60, № 2. С. 740–745.
61. Kim H. и др. Colanic Acid Is a Novel Phage Receptor of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Phage POP72 // *Front Microbiol.* Frontiers Media S.A., 2019. Т. 10. С. 143.
62. Huang X. и др. Identification and characterization of a locus putatively involved in colanic acid biosynthesis in *Vibrio alginolyticus* zj-51 // *Biofouling.* Taylor and Francis Ltd., 2018. Т. 34, № 1. С. 1–14.
63. Ren G. и др. Effects of lipopolysaccharide core sugar deficiency on colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* American Society for Microbiology, 2016. Т. 198, № 11. С. 1576–1584.
64. Stevenson G. и др. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid // *J Bacteriol.* American Society for Microbiology, 1996. Т. 178, № 16. С. 4885–4893.
65. Ranjit D.K., Young K.D. Colanic acid intermediates prevent de novo shape recovery of *Escherichia coli* spheroplasts, calling into question biological roles previously attributed to colanic acid // *J Bacteriol.* American Society for Microbiology, 2016. Т. 198, № 8. С. 1230–1240.
66. Scott P.M., Erickson K.M., Troutman J.M. Identification of the Functional Roles of Six Key Proteins in the Biosynthesis of *Enterobacteriaceae* Colanic Acid // *Biochemistry.* American Chemical Society, 2019. Т. 58, № 13. С. 1818–1830.
67. Reid A.J. и др. Tracking colanic acid repeat unit formation from stepwise biosynthesis inactivation in *Escherichia coli* // *Biochemistry.* ACS Publications, 2021. Т. 60, № 27. С. 2221–2230.
68. Pando J.M. и др. The Rcs-regulated colanic acid capsule maintains membrane potential in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* // *mBio.* American Society for Microbiology, 2017. Т. 8, № 3.

69. Clarke D.J. и др. Genetic analysis of the RcsC sensor kinase from *Escherichia coli* K-12 // J Bacteriol. American Society for Microbiology Journals, 2002. Т. 184, № 4. С. 1204–1208.
70. Takeda S.I. и др. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: A revised model of the RcsC → YojN → RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour // Mol Microbiol. Mol Microbiol, 2001. Т. 40, № 2. С. 440–450.
71. Brill J.A., Quinlan-Walshe C., Gottesman S. Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 // J Bacteriol. American Society for Microbiology Journals, 1988. Т. 170, № 6. С. 2599–2611.
72. Gottesman S., Trisler P., Torres-Cabassa A. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: Characterization of three regulatory genes // J Bacteriol. American Society for Microbiology Journals, 1985. Т. 162, № 3. С. 1111–1119.
73. Wang Q. и др. The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*: Dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes // J Bacteriol. American Society for Microbiology Journals, 2007. Т. 189, № 23. С. 8447–8457.
74. Stout V. и др. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis // J Bacteriol. American Society for Microbiology Journals, 1991. Т. 173, № 5. С. 1738–1747.
75. Sledjeski D.D., Gottesman S. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 // J Bacteriol. American Society for Microbiology, 1996. Т. 178, № 4. С. 1204–1206.
76. Zhang X.S., García-Contreras R., Wood T.K. *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA) // ISME Journal. Nature Publishing Group, 2008. Т. 2, № 6. С. 615–631.

77. Genevaux P. и др. DjlA Is a Third DnaK Co-chaperone of *Escherichia coli*, and DjlA-mediated Induction of Colanic Acid Capsule Requires DjlA-DnaK Interaction // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Т. 276, № 11. С. 7906–7912.
78. Shiba Y., Matsumoto K., Hara H. DjlA negatively regulates the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli* // *Genes Genet Syst*. *Genes Genet Syst*, 2006. Т. 81, № 1. С. 51–56.
79. Potrykus J., Wągrzyn G. The *ypdI* gene codes for a putative lipoprotein involved in the synthesis of colanic acid in *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol Lett*. Oxford University Press (OUP), 2004. Т. 235, № 2. С. 265–271.
80. Navasa N. и др. Transcriptional control of RfaH on polysialic and colanic acid synthesis by *Escherichia coli* K92 // *FEBS Lett*. *FEBS Lett*, 2014. Т. 588, № 6. С. 922–928.
81. Whitfield C., Roberts I.S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli* // *Mol Microbiol*. Blackwell Publishing Ltd., 1999. Т. 31, № 5. С. 1307–1319.
82. Whitfield C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli* // *Annu Rev Biochem*. *Annual Reviews*, 2006. Т. 75, № 1. С. 39–68.
83. Keenleyside W.J. и др. Coexpression of colanic acid and serotype-specific capsular polysaccharides in *Escherichia coli* strains with group II K antigens // *Journal of Bacteriology*. *J Bacteriol*, 1993. Т. 175, № 20. С. 6725–6730.
84. Jayaratne P. и др. Characterization of *rscB* and *rscC* from *Escherichia coli* O9:K30:H12 and examination of the role of the *rsc* regulatory system in expression of group I capsular polysaccharides // *J Bacteriol*. *J Bacteriol*, 1993. Т. 175, № 17. С. 5384–5394.
85. Russo T.A. и др. The construction and characterization of colanic acid-deficient mutants in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (O4/K54/H5) // *Microb Pathog*. *Microb Pathog*, 1995. Т. 18, № 4. С. 269–278.

86. Danese P.N., Pratt L.A., Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture // J Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM), 2000. Т. 182, № 12. С. 3593–3596.
87. Chen J., Lee S.M., Mao Y. Protective effect of exopolysaccharide colanic acid of *Escherichia coli* O157:H7 to osmotic and oxidative stress // Int J Food Microbiol. 2004. Т. 93, № 3. С. 281–286.
88. Hagiwara D. и др. Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli* // J Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM), 2003. Т. 185, № 19. С. 5735–5746.
89. Meredith T.C. и др. Modification of lipopolysaccharide with colanic acid (M-antigen) repeats in *Escherichia coli* // Journal of Biological Chemistry. 2007. Т. 282, № 11. С. 7790–7798.
90. Rajagopal S., Sudarsan N., Nickerson K.W. Sodium dodecyl sulfate hypersensitivity of *clpP* and *clpB* mutants of *Escherichia coli* // Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology (ASM), 2002. Т. 68, № 8. С. 4117–4121.
91. Prigent-Combaret C. и др. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli* // J Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM), 1999. Т. 181, № 19. С. 5993–6002.
92. Marshall K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces // American Society for Microbiology News. 1992. Т. 58. С. 202–207.
93. Van Loosdrecht M.C.M. и др. Influence of interfaces on microbial activity // Microbiological Reviews. American Society for Microbiology (ASM), 1990. Т. 54, № 1. С. 75–87.
94. Lee C.C., Chen J., Frank J.F. Role of cellulose and colanic acid in attachment of shiga toxin-producing *Escherichia coli* to lettuce and spinach in different water hardness environments // J Food Prot. International Association for Food Protection, 2015. Т. 78, № 8. С. 1461–1466.

95. Yoshida K. и др. Impacts of hydrophilic colanic acid on bacterial attachment to microfiltration membranes and subsequent membrane biofouling // *Water Res.* Elsevier Ltd, 2015. Т. 76. С. 33–42.
96. Евсеев П.В. и др. Новый вирулентный бактериофаг *Klebsiella pneumoniae* КРРК108.1, инфицирующий штаммы серотипа К108 // *Вестник Российского государственного медицинского университета*, 2021. № 6. С. 73–80.
97. Baba T. и др. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection // *Mol Syst Biol.* European Molecular Biology Organization, 2006. Т. 2. С. 2006.0008.
98. Ito A. и др. Metolazone upregulates mitochondrial chaperones and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* // *Biogerontology.* Springer Science and Business Media B.V., 2021. Т. 22, № 1. С. 119–131.
99. Benedetti C. и др. Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response // *Genetics.* 2006. Т. 174, № 1. С. 229–239.
100. Moskalev A. и др. Developing criteria for evaluation of geroprotectors as a key stage toward translation to the clinic // *Aging Cell.* Wiley Online Library, 2016. Т. 15, № 3. С. 407–415.
101. Macone A.B. и др. Mucoid *Escherichia coli* in Cystic Fibrosis // *New England Journal of Medicine.* N Engl J Med, 1981. Т. 304, № 24. С. 1445–1449.
102. Lippolis J.D. и др. Genomic and transcriptomic analysis of *Escherichia coli* strains associated with persistent and transient bovine mastitis and the role of colanic acid // *Infect Immun.* American Society for Microbiology, 2018. Т. 86, № 1. С. 10–1128.
103. Miajlovic H. и др. Response of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* to human serum reveals a protective role for Rcs-regulated exopolysaccharide colanic acid // *Infect Immun.* American Society for Microbiology (ASM), 2014. Т. 82, № 1. С. 298–305.
104. Erickson K.D., Detweiler C.S. The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates ydeI, a gene important for persistent

- Salmonella* infection of mice // Mol Microbiol. NIH Public Access, 2006. Т. 62, № 3. С. 883–894.
105. Mouslim C., Delgado M., Groisman E.A. Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence // Mol Microbiol. Mol Microbiol, 2004. Т. 54, № 2. С. 386–395.
106. Barry G.T. Colominic acid, a polymer of N-acetylneuraminic acid. // J Exp Med. The Rockefeller University Press, 1958. Т. 107, № 4. С. 507–521.
107. McGuire E.J., Binkley S.B. The Structure and Chemistry of Colominic Acid // Biochemistry. American Chemical Society, 1964. Т. 3, № 2. С. 247–251.
108. Westphal. O., Jann. K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol–water and further applications of the procedure // Methods Carbohydr Chem. 1965. Т. 5. С. 83–91.
109. Meredith T.C. и др. Redefining the requisite lipopolysaccharide structure in *Escherichia coli* // ACS Chem Biol. American Chemical Society, 2006. Т. 1, № 1. С. 33–42.
110. Burgess R.R. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques // Guide to Protein Purification, 2nd Edition / изд. Burgess R.R., Deutscher M.P.B.T.-M. in E. Academic Press, 2009. Т. 463. С. 331–342.
111. Green A.A., Hughes W.L.B.T.-M. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. Academic Press, 1955. Т. 1. С. 67–90.
112. Oliveira R., Marques F., Azeredo J. Purification of polysaccharides from a biofilm matrix by selective precipitation of proteins // Biotechnology Techniques. Springer, 1999. Т. 13, № 6. С. 391–393.
113. Peng Y. и др. Deproteinization and structural characterization of bioactive exopolysaccharides from *Ganoderma sinense* mycelium // Separation Science and Technology (Philadelphia). Taylor and Francis Inc., 2016. Т. 51, № 2. С. 359–369.

114. Xu J. и др. Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation // *Int J Biol Macromol*. Elsevier, 2014. Т. 67. С. 205–209.
115. Oparka M. и др. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer // *Methods*. Elsevier, 2016. Т. 109. С. 3–11.
116. Миронов А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Гриф и К, 2012.
117. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents // *OECD Guideline for the Testing of Chemicals*. Section 4: Health Effects. OECD Paris, 2008.
118. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (No 123, Council of Europe). Strasbourg, 1986.
119. Turner P. V и др. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider // *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. American Association for Laboratory Animal Science, 2011. Т. 50, № 5. С. 600–613.
120. Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioral despair in mice: A primary screening test for antidepressants // *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977. Т. 229, № 2. С. 327–336.
121. Каркищенко Н.Н. и др. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность // Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств влияющих на физическую работоспособность / изд. Каркищенко Н.Н. Москва: Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (Светлые горы), 2017.
122. Hsu Y.-J. и др. Capsaicin Supplementation Reduces Physical Fatigue and Improves Exercise Performance in Mice // *Nutrients*. MDPI AG, 2016. Т. 8, № 10. С. 648.

123. Huang W.C. и др. Association of physical performance and biochemical profile of mice with intrinsic endurance swimming // Int J Med Sci. Ivyspring International Publisher, 2016. Т. 13, № 12. С. 892–901.
124. Hsu T.-H. и др. Supplementation with Beef Extract Improves Exercise Performance and Reduces Post-Exercise Fatigue Independent of Gut Microbiota // Nutrients. MDPI AG, 2018. Т. 10, № 11. С. 1740.
125. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J Cell Biol. The Rockefeller University Press, 1963. Т. 17, № 1. С. 208.
126. Пауков В.С., Фролов В.А. Элементы теории патологии сердца. Москва: Медицина, 1982. 270 С.
127. Lam J. и др. A universal approach to analyzing transmission electron microscopy with ImageJ // Cells. Mdpi, 2021. Т. 10, № 9. С. 2177.
128. Tsvetikova S.A., Koshel E.I. Optimized Protocol for Production and Extraction of Colanic Acid from E. coli Culture // Russ J Bioorg Chem. Springer, 2024. Т. 50, № 4. С. 1357–1364.
129. Bales P.M. и др. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens // PLoS One / изд. Driks A. Public Library of Science, 2013. Т. 8, № 6. С. e67950.
130. Tsvetikova S.A. и др. Stimulatory Effect on Mice by Bacterial Exopolysaccharide, Colanic Acid // Russ J Bioorg Chem. 2024. Т. 50, № 2.
131. Tsvetikova S.A. и др. Cellular Effects of Enterobacteriaceae Polysaccharide Colanic Acid // Int J Mol Sci. MDPI, 2024. Т. 25, № 15. С. 8017.
132. Wang S. и др. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes // Int J Cancer. Wiley Online Library, 1997. Т. 70, № 6. С. 699–705.
133. McMahon D.K. и др. C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties // American Journal of Physiology-Cell Physiology. American Physiological Society Bethesda, MD, 1994. Т. 266, № 6. С. C1795–C1802.

134. Schöneich C. и др. Apoptosis in differentiating C2C12 muscle cells selectively targets Bcl-2-deficient myotubes // *Apoptosis*. Springer, 2014. Т. 19. С. 42–57.
135. Malinska D. и др. Changes in mitochondrial reactive oxygen species synthesis during differentiation of skeletal muscle cells // *Mitochondrion*. Elsevier, 2012. Т. 12, № 1. С. 144–148.
136. Sundberg J.P., Cordy W.R., King L.E. Alopecia areata in aging C3H/HeJ Mice // *Journal of Investigative Dermatology*. *J Invest Dermatol*, 1994. Т. 102, № 6. С. 847–856.
137. Arck P.C. и др. Stress inhibits hair growth in mice by induction of premature catagen development and deleterious perifollicular inflammatory events via neuropeptide substance P-dependent pathways // *Am J Pathol*. Elsevier, 2003. Т. 162, № 3. С. 803–814.
138. McElwee K.J. и др. The pathogenesis of alopecia areata in rodent models // *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Blackwell Publishing Inc., 2003. Т. 8, № 1. С. 6–11.
139. Wallig M.A. и др. *Fundamentals of toxicologic pathology*. Academic Press, 2017.
140. Payne J.R., Kotwinski P.J., Montgomery H.E. Cardiac effects of anabolic steroids // *Heart*. BMJ Publishing Group, 2004. Т. 90, № 5. С. 473–475.
141. Toda K. и др. Black ginger extract increases physical fitness performance and muscular endurance by improving inflammation and energy metabolism // *Heliyon*. Elsevier Ltd, 2016. Т. 2, № 5.
142. Chen Y.M. и др. *Lactobacillus plantarum* TWK10 supplementation improves exercise performance and increases muscle mass in mice // *Nutrients*. MDPI AG, 2016. Т. 8, № 4.