

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования  
«Южный федеральный университет»

«УТВЕРЖДАЮ»  
д.б.н. В.А. Чистяков

---

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.

ОТЧЁТ О НИР

на тему:

«Проведение экспериментов по контролю генотоксинов в кормах для птиц»

Соглашение РФФ № 16-16-04032 от 11.08.2016 г (вн. № 213.01-03/2016-9) по  
научному проекту «Замедление репродуктивного старения кур с помощью культур  
пробиотических микроорганизмов – продуцентов веществ с антиоксидантной и ДНК-  
протекторной активностью»

Руководитель: д.б.н., В.А. Чистяков

Исполнитель: член-корр. РАН, д.б.н., А.В. Тутельян

Ростов-на-Дону  
2016г.

Качество корма является важным фактором, от которого в значительной мере зависит продуктивность птицеводческого хозяйства. Современные методы анализа качества корма, такие, как ИК-спектроскопия, или ряд методов химического анализа отдельных высокомолекулярных компонентов [1], направлены на оценку содержания в корме питательных веществ. Гораздо меньше внимания уделяется оценке возможного содержания токсических, генотоксических и мутагенных веществ. Поскольку генотоксичность и мутагенность – явления, реализующиеся на молекулярно-клеточном уровне, очевидно, что подобный анализ должен проводиться при помощи модельных систем, в которых присутствуют живые клетки.

Примером подобной системы является тест-система, основанная на бактериальных биосенсорах. LUX-биосенсоров – генноинженерных штаммов *Escherichia coli*, в которых оперон билюминесценции морских фотобактерий *Photobacterium luminescens* поставлен под контроль промоторов, в норме контролирующих экспрессию оперонов, обеспечивающих стрессовую устойчивость бактериальной клетки [2]. Клетки биосенсоров содержат гибридные плазмиды с lux-генами бактериальной люциферазы, находящимися под контролем индуцируемых стрессовых промоторов, активирующихся в ответ на повреждение ДНК или другой, интересующий исследователя фактор. Количественная оценка уровня повреждений происходит за счет измерения уровня билюминесценции. Подобный тест позволяет не только оценить уровень повреждения ДНК, но и степень окислительного стресса, если повреждающий фактор является одновременно и прооксидантом.

Экстракцию потенциальных генотоксинов проводили по методу [3]. Тестирование на биосенсорных штаммах *E. coli* MG1655 с плазмидами pRecA-lux (реагирует на повреждение ДНК), pKatG-lux (реагирует на генерацию перекиси водорода), pSoxS-lux (реагирует на супероксид-анион-радикал) и pXen7-lux (индикатор неспецифической токсичности) показало, что два образца корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий В-1895 и КАТМІРА 1933, отобранные 6.10.2016 (образцы 1 и 2, соответственно), не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов. При действии образца (2) наблюдалось подавление жизнедеятельности биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 pXen7-lux на 6,6 %; подобный эффект можно считать незначительным по сравнению с действием контрольного вещества ( $ZnSO_4$ ). Для остальных штаммов при действии обоих образцов эффект был нулевым.

Следующим этапом была проверка на мутагенность. Поскольку ряд соединений-ксенобиотиков, не проявляющих генотоксической активности в первичном скрининге, может при взаимодействии с ферментными системами эукариот превращаться в свои генотоксические и мутагенные производные, мы использовали тест с т.н. метаболической активацией, при которой в систему вводится препарат, содержащий важнейшие компоненты системы трансформации ксенобиотиков. В нашем случае использовались коммерческий препарат микросомальной фракции печени крыс S9 (Moltox, USA) и гомогенат печени крыс, полученный перед экспериментом (любезно предоставлен С.К. Абиловым, ИОГЕН РАН, Москва). Для тестирования эффективности этих двух вариантов метаболической активации был поставлен опыт по классической методике [4]. В качестве

положительных контролей без участия смеси S9 использовались растворы мутагенов в DMSO – 2-нитрофлуорен (для TA98, C=50 мкг/мл) и азид натрия (для TA100, C=100 мкг/мл), в качестве положительного контроля метаболической активации использовались разведения 2-аминоантрацена в концентрациях 5, 10 и 50 мкг/мл в DMSO. В качестве отрицательного контроля на чашку вносили DMSO.

Было обнаружено, что метаболическая активация при использовании препарата S9 неэффективна, тогда как гомогенат печени крыс, несмотря на долгий период хранения, успешно активировал стандартный мутаген – 2-аминоантрацен (табл. 1)

Таблица 1 – Сравнение эффективности метаболической активации с использованием коммерческого лиофилизата S9 и гомогената печени крыс.

Штамм <i>Salmonella typhimurium</i>	Образец	Среднее число колоний на чашках	
		Лиофилизат (коммерческий препарат)	Гомогенат (препарат ИОГЕН)
TA98	DMSO	16±2	16±5
	2-аминоантрацен (50 мкг/мл)	16±3	2000±56
TA100	DMSO	111±14	110±17
	2-аминоантрацен (50 мкг/мл)	111±19	1900±44

Оценку мутагенности корма проводили по методике, модифицированной с учетом полученных данных.

Опыт ставили в трех повторностях. На чашку вносили 50 мкл суточной культуры TA100 и 50 мкл спиртового экстракта образца корма. В качестве отрицательного контроля использовали DMSO, в качестве положительного - азид натрия в концентрации 100 мкг/мл.

Результаты представлены в таблице 2. При действии спиртового экстракта корма не наблюдалось статистически достоверного усиления уровня мутагенеза, тогда как положительный контроль демонстрировал обычное для данного теста усиление уровня мутагенеза на 2 порядка.

Табл.2 Результаты теста Эймса на штаммах TA98 и TA100, среднее число колоний (определение мутагенности корма).

Группы	TA100	TA98
Этанол, контроль	68±4	25±5
2-аминоантрацен (50 мкг/мл)	2000±56	984±42
Экстракт корма 1	47±19	18±3
Экстракт кормовой добавки (2)	57±19	23±3

Таким образом, можно заключить, что изученные образцы корма не содержат потенциальных генотоксикантов и мутагенов.

1. И. П. Кондрахин. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник — М.: Колос,. — 520 с.. 2004
2. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса//Биотехнология. – 2009. - №6. - С.16-25
3. Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Сазыкин И.С. Генотоксичность донных отложений р. Дон (2001-2007 гг.) // Водные ресурсы. 2012. Т. 39, № 1. С. 92-98.
4. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay // Mutat Res. 2000. Vol. 455(1-2). P. 29-60.