

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

«УТВЕРЖДАЮ»

д.б.н. В.А. Чистяков

« ____ » _____ 2017 г.

ОТЧЁТ

на тему:

«Проведение экспериментов по тестированию токсичности и генотоксичности образцов
кормов и компонентов кормов для выращивания кур,
используемых в проекте РНФ № 16-16-04032,
отобранных в январе и феврале 2017 г.»

Соглашение РНФ № 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.м.н., А.В. Тутельян

Ростов-на-Дону

2017г.

Задачей данного проекта является оценка эффективности препаратов пробиотических бактерий, выделяющих в окружающую среду вещества, инактивирующие активные формы кислорода (АФК) и стабилизирующие ДНК клетки. Предположение о существовании такой активности основано на представлении о старении как «медленном отравлении» эндогенными прооксидантами и генотоксинами [1]. При этом признание запрограммированности старения отнюдь не противоречит представлениям об участии в реализации такой программы свободнорадикальных механизмов и повреждения ДНК [2]. Очевидно, что важным условием чистоты хронического эксперимента по замедлению старения с помощью протекторов от эндогенных токсинов является сведение к минимуму, а в идеале - отсутствие, контактов тест-объекта с токсинами экзогенными. Поэтому помимо стандартного контроля содержания в корме исследуемых птиц токсинов, осуществляемого методами химического анализа было принято решение о дополнительном контроле методами тестирования мутагенности и генотоксичности с помощью модельных систем, в которых присутствуют живые клетки.

В ходе предыдущего этапа проекта был применен комплекс методов с использованием LUX-биосенсоров на основе *E. coli* и теста Эймса (*Salmonella*/микросомы). Для метаболической активации промутагенов использовали S9 фракцию гомогената печени крыс. Данный препарат традиционно используется для выявления веществ, потенциально опасных для человека. Однако в условиях нашего проекта более логичным является использование препарата из печени кур.

Материалы и методы

Экстракцию потенциальных генотоксинов проводили по методу [4]. 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) [3]

проводили по методу [4]. Мутагенную активность определяли по методу [5].

Для оптимизации протокола получения S-9 фракции печени кур использовали четыре препарата фракции S9 для метаболической активации промутагенов.

Препарат №1 на основе гомогената печени крыс, получен по стандартной методике с использованием Арохлора 1254 (Sigma-Aldrich) [6]. Содержание белка в препарате – 10 мг/мл (биуретовый метод <http://www.olvex-d.ru/catalog/biohim-nabori/substraty/tovar-71.html>). Препарат хранили при -20⁰С.

Препарат № 2 получали по следующей методике. Кур используемого в проекте кросса Хайсекс-Браун возраста 133 дня веса 1,8 – 2,0 кг декапитировали, кровь сливали, тушки немедленно вскрывали, извлекали печень, промывали стерильным 0,1 М КСl и помещали на лед. Затем печень гомогенизировали в стальном механическом гомогенизаторе (MPW-302, Польша) в течение 2-х минут при скорости 2000 об/мин (предварительная гомогенизация) с последующей гомогенизацией в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в 9 объемах 0,15 М NaCl. Все операции гомогенизации также проводили на льду. Выделение микросомальной фракции проводили с помощью дифференциального центрифугирования по стандартной методике [7]. Содержание белка в препарате доводили до 10 мг/мл разбавляя буфером для гомогенизации. Готовый препарат хранили при -20⁰С.

Препарат №3 получали по методике, аналогичной примененной для препарата №2. Готовый препарат хранили при -80⁰С.

Препарат №4 получали по методике, аналогичной примененной для препарата №2. За исключением того, что в буфер для гомогенизации добавляли 3% глицерина, а готовый препарат хранили при -20⁰С с добавлением глицерина до концентрации 30%.

В качестве стандартного промутагена, требующего 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.

Результаты и их обсуждение

Оптимизация протокола получения S-9 фракции из печени кур.

Результаты проверки качества препаратов микросомальной фракции представлены в таблице 1. Минимальной активирующей активностью обладает препарат №2. Тест Эймса с использованием штаммов TA100 и TA98 и данного препарата не позволяет зарегистрировать мутагенное действие 2-аминоантрацена в дозе 1 мкг на чашку. Активность препарата №1, на основе микросомальной фракции крысы, достаточна для выявления мутагенности всех вариантов обработки за исключением действия минимальной дозы 2-аминоантрацена на штамм TA98. Препараты №3 и 4 эффективны для всех сочетаний доз и штаммов.

Таким образом, можно сделать вывод, что хотя препарат фракции S-9 из печени кур, приготовленный и хранимый по стандартной методике, позволяет выявлять генетическую активность использованного промутагена в принципе, он обладает «повышенной требовательностью» к температуре хранения (табл. 1). Однако введение криопротектора глицерина в буфер для гомогенизации и в буфер для хранения позволило компенсировать этот недостаток. Ввиду вышеизложенного, для мониторинга качества корма далее использовали препарат S-9, полученный методом №4.

Оценка генотоксичности, токсичности и мутагенности образцов корма и кормовой добавки, отобранных в январе и феврале 2017 г.

Генотоксичность.

Тестирование токсичности и генотоксичности образцов корма (экстракта корма и кормовой добавки) показало, что образцы корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий В-1895 и КАТМІРА 1933, не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов. При действии образца добавки наблюдалось подавление жизнедеятельности биосенсорного

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

Штамм <i>Salmonella typhimurium</i>	Исследуемые образцы	Среднее число колоний на чашках			
		Препарат 1	Препарат 2	Препарат 3	Препарат 4
ТА98	DMSO (Контроль)	26±5	19±5	24±3	25±5
	2-аминоантрацен (1 мкг/чашку)	32±6	28±8	150±21*	139±10*
	2-аминоантрацен (20 мкг/чашку)	864±92*	255±35*	987±115*	1010±93*
	2-аминоантрацен (50 мкг/чашку)	1680±239*	2100±156*	2040±234*	2110±190*
ТА100	DMSO (Контроль)	209±14	210±17	176±19	206±14
	2-аминоантрацен (1 мкг/мл)	315±19*	205±44	357±34*	299±34*
	2-аминоантрацен (20 мкг/чашку)	508±64*	990±219*	2670±178*	2580±194*
	2-аминоантрацен (50 мкг/чашку)	2960±119*	3010±190*	3050±179*	3200±216*

* - статистически значимый мутагенный эффект (t-тест, $p < 0,05$)

штамма *E. coli* MG1655 pXen7-lux на 8,2 %; подобный эффект можно считать незначительным по сравнению с действием контрольного вещества ($ZnSO_4$). Для остальных штаммов при действии обоих образцов эффект был нулевым.

Оценка генотоксичности, токсичности и мутагенности образцов корма и кормовой добавки, отобранных в январе и феврале 2017 г.

Генотоксичность.

Тестирование токсичности и генотоксичности образцов корма (экстракта корма и кормовой добавки) показало, что образцы корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий В-1895 и КАТМИРА 1933, не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов. При действии образца добавки наблюдалось подавление жизнедеятельности биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 pXen7-lux на 8,2 %; подобный эффект можно считать незначительным по сравнению с действием контрольного вещества ($ZnSO_4$).

Для остальных штаммов при действии обоих образцов эффект был нулевым.

Мутагенность.

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 - 2-аминоантрацен в концентрации 1 мкг/чашку.

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.

Таблица 2. Мониторинг мутагенности корма, тест Эймса на штаммах TA98 и TA100, среднее число колоний.

№	Дата	Штамм	Образцы				Заключение о мутагенности кормов +/-
			DMSO контроль	2-аминоантрацен (1 мкг/чашку, позитивный контроль)	Экстракт корма 1	Экстракт кормовой добавки 2	
1	11.01.17	TA100	135±46	1115±56	141±15	111±17	-
		TA98	68±4	470±36	87±19	37±9	-
2	9.02.17	TA100	128±42	1102±49	133±19	111±17	-
		TA98	63±4	457±27	66±14	58±10	-

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

Список использованной литературы

1. Skulachev V.P. How to clean the dirtiest place in the cell: cationic antioxidants as intramitochondrial ROS scavengers// IUBMB Life – 2005. – 57. – P. 305 – 310.
2. Скулачев В.П. Что такое «феноптоз» и как с ним бороться// Биохимия - 2012. – Т. 77. - В. 7. – С. 827 – 846.

3. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса//Биотехнология. – 2009. - №6. - С. 16 – 25.
4. 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.
5. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay // Mutat Res. - 2000. - Vol. 455(1-2). - P. 29-60.
6. Герхардт Ф. (ред) Методы общей бактериологии. - Том 2. - М.: Мир, 1983г. - С. 50-51.
7. Абилев С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии. – М.: СПб.: Нестор-История, 2015. - 304 с.