

Протекторное действие супернатантов лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp. из вечной мерзлоты на ДНК лейкоцитов крови лабораторных мышей (посвящается памяти Потапова В.Д.)

М.В.Аверин¹, М.Б.Бородулин¹, А.Б.Галеев^{1,2}, Г.И.Грива¹, Н.С.Захарченко³, С.Г.Игнатов⁴, В.П.Мельников^{1,5}, В.Д.Потапов⁴, Е.Б.Рукавцова⁴, Р.Н.Храмов^{1,6}, Т.Г.Щербатюк⁷, А.В.Брушков^{8,9}

¹АНО «Губернская академия», Тюмень, Российская Федерация;

²Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Российская Федерация;

³Филиал Института биоорганической химии им. академиком М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пушкино, Российская Федерация;

⁴ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

⁵Институт криосферы Земли – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр» СО РАН, Тюмень, Российская Федерация;

⁶ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН, Пушкино, Российская Федерация;

⁷ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация;

⁸ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация;

⁹ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», Тюмень, Российская Федерация

В последние десятилетия наблюдается повышенный интерес как к известным пробиотикам, так и к новым источникам, раскрытие потенциала которых позволит сохранить и поддержать здоровье. С помощью современного метода молекулярной геноксикологии «комета-тест» исследовано защитное действие метабитиков и/или лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp., выделенных из вечной мерзлоты Центральной Якутии, на ДНК лейкоцитов периферической крови лабораторных мышей. Из бактериальных культур получали лизаты после обработки с помощью Френч-пресса или ультразвука в выбранных режимах. Лейкоциты крови мыши инкубировали в течение 20 мин при 37°C в присутствии супернатантов лизатов либо нативных клеток и подвергали нагрузочному тесту (пероксид водорода в концентрации 20 мкМ в течение 10 мин при 37°C).

Обнаружено, что уровень повреждений ДНК в присутствии супернатантов лизатов в среднем достоверно (на 40%) меньше по сравнению с контролем (инкубация в фосфатном буфере) и по сравнению с инкубацией в супернатанте от нативных бактерий (метабитик), который не показал защитного действия. Показано, что защитный эффект сохранялся при разведении супернатантов лизатов *Bacillus* sp. в 18 раз, а его величина линейно зависела от длительности инкубации (10–40 мин). Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения лизатов *Bacillus* sp. в биомедицине.

Ключевые слова: Bacillus sp., лизаты бактерий, ДНК лейкоцитов, протекторное действие

Для цитирования: Аверин М.В., Бородулин М.Б., Галеев А.Б., Грива Г.И., Захарченко Н.С., Игнатов С.Г., Мельников В.П., Потапов В.Д., Рукавцова Е.Б., Храмов Р.Н., Щербатюк Т.Г., Брушков А.В. Протекторное действие супернатантов лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp. из вечной мерзлоты на ДНК лейкоцитов крови лабораторных мышей (посвящается памяти Потапова В.Д.). Бактериология. 2022; 7(4): 24–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-24-33

Для корреспонденции:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-046
E-mail: ignatov@obolensk.org

Статья поступила 12.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-046
E-mail: ignatov@obolensk.org

The article was received 12.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Protective action of supernatant lysates of relict bacteria *Bacillus* sp. from permafrost on the blood leukocytes DNA of laboratory mice (dedicated to the memory of Potapov V.D.)

M.V.Averin¹, M.B.Borodulin¹, A.B.Gapeev^{1,2}, G.I.Griva², N.S.Zakharchenko³, S.G.Ignatov⁴, V.P.Melnikov^{1,5},
V.D.Potapov⁴, E.B.Rukavtsova⁴, R.N.Khramov^{1,6}, T.G.Shcherbatyuk⁷, A.V.Brouchkov^{8,9}

¹Autonomous non-profit organization «Provincial Academy», Tyumen, Russian Federation;

²Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of the Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», Pushchino, Russian Federation;

³Branch of the Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation;

⁴State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

⁵Institute of Earth Cryosphere Tyumen Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences;

⁶Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation;

⁷Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

⁸Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

⁹Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation

In recent decades, there has been an increased interest in both known probiotics and new sources, the disclosure of the potential of which will preserve and maintain human health. The protective effect of metabiotics and/or lysates of relict bacteria *Bacillus* sp., isolated from the permafrost of Central Yakutia, on the DNA of peripheral blood leukocytes of laboratory mice was studied using the modern method of molecular genotoxicology «comet-test». Lysates were obtained from bacterial cultures after treatment with a French press or ultrasound in the selected modes. Mouse blood leukocytes were incubated for 20 min at 37°C in the presence of lysate supernatants or native cells, and subjected to a stress test (hydrogen peroxide at a concentration of 20 µM for 10 min at 37°C).

It was found that the level of DNA damage in the presence of lysate supernatants was on average significantly lower by 40% compared with the control (incubation in phosphate buffer) and compared with incubation in the supernatant from native bacteria (metabiotic), which did not show a protective effect. It was shown that the protective effect was preserved when the supernatants of *Bacillus* sp. lysates were diluted. 18 times, and its value linearly depended on the duration of incubation for 10–40 minutes. The results obtained indicate the prospects for the use of lysates of *Bacillus* sp. in biomedicine.

Key words: *Bacillus* sp., bacterial lysates, leukocyte DNA, protective effect

For citation: Averin M.V., Borodulin M.B., Gapeev A.B., Griva G.I., Zakharchenko N.S., Ignatov S.G., Melnikov V.P., **Potapov V.D.**, Rukavtsova E.B., Khramov R.N., Shcherbatyuk T.G., Brouchkov A.V. Protective action of supernatant lysates of relict bacteria *Bacillus* sp. from permafrost on the blood leukocytes DNA of laboratory mice (dedicated to the memory of Potapov V.D.). *Bacteriology*. 2022; 7(4): 24–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-24-33

Плезные свойства пробиотиков для улучшения здоровья, модуляции иммунной системы, лечения целого ряда заболеваний большинством исследователей считаются установленными [1, 2]. Однако существует и противоположное мнение, что пробиотики полезны только для желудочно-кишечного тракта, в то время как их эффект на целостный организм преувеличен [3]. В последнее время появились сведения о феноменальной жизнеспособности некоторых бактерий из древней каменной соли [4], янтаря [5] и вечной мерзлоты [6], возраст которых достигает десятков и даже сотен миллионов лет [7]. Вероятно, такие бактерии способны защищать геном в течение своего продолжительного существования [8, 9]. Есть предположение, что такие бактерии могут быть полезны в геронтологии [10].

Цель нашей работы состояла в оценке возможности защитного действия metabiотиков и/или лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp., выделенных из вечной мерзлоты Центральной Якутии [11], на ДНК лейкоцитов крови лабора-

торных животных. Параллельно решались задачи оптимизации условий культивирования бактерий для последующего получения metabiотиков и лизатов в необходимом объеме, а также способов получения лизатов.

Материалы и методы

Штамм бактерий, условия выращивания

В работе использовали штамм бактерий *Bacillus* sp., полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Бактериальную культуру выращивали в жидкой среде LB [12], содержащей бакто-триптон (Difco, США) – 10 г/л, дрожжевой экстракт (Difco, США) – 5 г/л, NaCl – 10 г/л, на орбитальном шейкере при 37°C, 130 об./мин. В качестве агаризованной среды для бактерий *Bacillus* sp. использовали рыбнопептонный агар (1 л отвара из 500 г рыбы, 10 г пептона, 5 г NaCl, 15 г агара (Pronadisa, Испания), pH 7,0–7,2, автоклавирование при 121°C 20 мин).

Животные

В работе использовали лабораторных мышей линии BALB/c.

Определение кривых роста бактерий *Bacillus* sp.

Бактериальную культуру *Bacillus* sp. выращивали в течение 3 суток в жидкой среде LB на орбитальном шейкере при 37°C, 130 об./мин. Вначале вносили 1 мл ночной культуры с титром 1×10^{11} КОЕ/мл в 100 мл жидкой среды LB. Оптическую плотность культуры определяли при 600 нм на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 (Япония). Для подсчета колоний периодически отбирали пробы, разводили культуру в 10^6 раз жидкой средой LB, шпателем втирали разведения в чашки Петри с агаризованной средой РПА по 100 и 200 мкл. Определяли КОЕ (количество колониеобразующих единиц) в 1 мл культуры бактерий по формуле: (число колоний, выросших после разведения \times коэффициент разведения) / объем разведенной суспензии для посева. Параллельно для некоторых точек роста было определено количество клеток в культуральной жидкости на цитофлуориметре NovoCyte (Agilent, США).

Приготовление лизатов бактерий *Bacillus* sp.

После культивирования и разведения биомассы в фосфатном буфере (ФБ) в 6 раз (136,7 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄, pH = 7,2) бактерии *Bacillus* sp. были высеяны для подсчета клеток в чашки Петри на среду РПА. Полученная биомасса может храниться в замороженном виде при -20°C как минимум в течение 8 мес. без потери свойств. Для приготовления лизатов бактерий часть клеток в ФБ была разрушена на Френч-прессе (ИБФМ РАН, Пущино, Россия) при 2000 атм. Другую часть клеток в ФБ разрушали ультразвуком (20 кГц, 30-секундная обработка ультразвуком с минутным интервалом между тремя повторами) при интенсивности до 1 кДж на аппарате Sonicator (QSonica, США). С помощью центрифугирования (3 мин при 10000 об./мин, центрифуга MiniSpin, Германия) получены супернатанты, содержащие экстра- и внутриклеточные метаболиты бактерий, но не содержащие сами бактерии и их обломки. Микроскопическое исследование лизатов бактерий *Bacillus* sp. проводили на световом микроскопе Zeiss Axio Imager A1 (Zeiss, Германия), для фотографирования использовали фотокамеру AxioCam 506C camera (Zeiss, Германия).

Метод ДНК-комет (comet assay)

Были приготовлены микроскопные слайды из трех слоев 0,5%-й легкоплавкой агарозы (Serva, Германия) с лейкоцитами из периферической крови мышей, иммобилизованными в средний слой. Далее проводили процедуры «комета-теста»: лизис клеток в лизирующем растворе (1%-й лаурилсаркозинат натрия, 2,5 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М трис-HCl, pH 10 и 1%-й Тритон X-100) в течение 25 мин при 37°C; щелочная денатурация ДНК в щелочном растворе (0,3 М NaOH, 0,001 М ЭДТА, pH >13) в течение 20 мин при 4°C; электрофорез в свежей порции щелочного раствора в течение 20 мин при 4°C в электрофоретической камере SE-1/S-1N (ООО «Компания Хеликон», Москва) при напряженности электрического поля 2 В/см и силе тока 300 мА; ренатурация

ДНК при нормальном pH; окрашивание ДНК в ФБ, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия, в течение 1 ч. Перед анализом каждый слайд в течение 5 мин промывали в дистиллированной воде и накрывали покровным стеклом. Все процедуры проводили при искусственном освещении с использованием ламп накаливания во избежание возникновения дополнительных повреждений ДНК в клетках. Препараты анализировали с использованием аппаратно-программного комплекса «Комет Эксперт» (ООО «Ген Эксперт», Пущино). В качестве индикатора величины поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» (%ТДНК) [13]. Из каждого образца крови готовили необходимое число слайдов в соответствии с числом воздействий. На каждом слайде регистрировали по 30–50 изображений «комет», по которым рассчитывали средний уровень %ТДНК. Средние значения и стандартные ошибки среднего для каждого варианта воздействия вычисляли по результатам независимых экспериментов ($n \geq 9$).

Анализ генотоксического действия пероксида водорода при использовании супернатантов бактерий *Bacillus* sp.

С использованием супернатантов бактерий *Bacillus* sp. и супернатантов их лизатов проведена серия экспериментов (при разведении супернатантов в 6 раз) с лейкоцитами крови мыши методом ДНК-комет по следующему протоколу. К 40 мкл раствора (в 4 вариантах: ФБ, супернатант от нативных бактерий, супернатант от бактерий после Френч-пресса, супернатант от бактерий после обработки ультразвуком) добавляли 1,5 мкл периферической крови мыши, взятой из хвостовой вены, инкубировали 20 мин при 37°C. Далее готовили микроскопные агарозные слайды для метода ДНК-комет (по 3 слайда после каждого варианта инкубации). Готовые препараты инкубировали в присутствии генотоксического агента – 20 мкМ пероксида водорода (нагрузочный тест) в течение 10 мин при 37°C.

Анализ зависимости защитного эффекта супернатантов бактерий *Bacillus* sp. от длительности экспозиции

К 40 мкл растворов (в 4 вариантах: ФБ, супернатант от нативных бактерий, супернатант лизата, полученного из бактерий с помощью Френч-пресса, супернатант лизата, полученного из бактерий после обработки ультразвуком), добавляли по 1,5 мкл периферической крови мыши, взятой из хвостовой вены, и инкубировали в течение 10, 20 и 40 мин при 37°C. Далее готовили микроскопные агарозные слайды для метода ДНК-комет, по 3 слайда после каждого варианта инкубации. Готовые препараты инкубировали в присутствии 20 мкМ пероксида водорода (нагрузочный тест) в течение 10 мин при 37°C.

Анализ зависимости защитного эффекта от концентрации супернатантов бактерий

Для оценки зависимости защитного эффекта от концентрации супернатантов проведена серия экспериментов (при разведении супернатантов в 18 раз) с лейкоцитами крови мыши методом ДНК-комет по следующему протоколу. К 40 мкл растворов (в 4 вариантах: ФБ, супернатант от нативных бактерий, супернатант от бактерий после Френч-пресса, супернатант от бактерий после обработки ультразвуком)

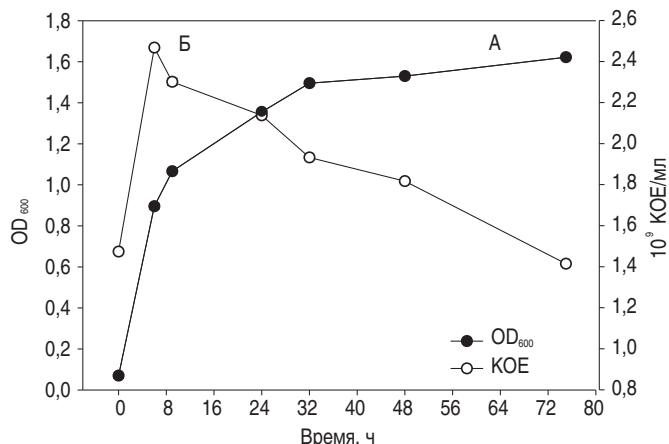


Рис. 1. Рост бактерий *Bacillus* sp. при периодическом культивировании. А – динамика изменения оптической плотности при 600 нм; Б – динамика роста бактерий (КОЕ/мл). Измерения проводили в трех аналитических и трех биологических повторностях. Различия оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

добавляли по 1,5 мкл периферической крови мыши, взятой из хвостовой вены, и инкубировали 20 мин при 37°C. Далее готовили микроскопные агарозные слайды для метода ДНК-комет, по 3 слайда после каждого варианта инкубации. Готовые препараты инкубировали в присутствии 20 мкМ пероксида водорода (нагрузочный тест) в течение 10 мин при 37°C.

Статистический анализ

Все эксперименты проведены по протоколу «слепого контроля», когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Все данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. Поскольку данные имели нормальное распределение (по тесту Колмогорова–Смирнова), то статистический анализ проводили с использованием ANOVA и критерия Даннета для множественного сравнения ($p < 0,01$), при парном сравнении групп данных использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна–Уитни ($p < 0,05$).

Результаты исследований

Первоначально было проведено выращивание бактерий *Bacillus* sp. при оптимальных условиях, установленных нами ранее [14] (жидкая среда LB, 37°C, 130 об./мин). Оптическую

плотность культуры определяли при 600 нм на спектрофотометре в течение 3 суток (рис. 1А). Динамику роста культуры определяли с помощью подсчета колоний на цитофлуориметре NovoCyte (Agilent, США), а также путем посева культуры на чашки Петри. Анализ культивирования исследуемых бактерий показал, что рост замедлялся после максимального накопления биомассы (6 ч) в конце экспоненциальной фазы, затем наблюдалось снижение числа живых бактерий (рис. 1Б). Приведенные графики демонстрируют, что определение количества живых бактерий по оптической плотности не всегда информативно, особенно после экспоненциальной фазы роста.

Полученные данные могут иметь важное значение для оптимизации условий культивирования бактерий *Bacillus* sp. и дальнейшего применения метаболитов и пробиотиков на их основе в прикладных биотехнологических исследованиях и медицине [15].

Для дальнейших экспериментов на лейкоцитах крови лабораторных мышей были приготовлены лизаты бактерий *Bacillus* sp. Часть клеток в ФБ была разрушена на Френч-прессе при 20 атм, другая часть клеток в ФБ была разрушена импульсным ультразвуком. Микроскопическое исследование бактерий *Bacillus* sp. показало, что разрушение клеток с помощью Френч-пресса более эффективно по сравнению с воздействием ультразвука (рис. 2). Это же подтвердилось с помощью высева на чашки Петри со средой РПА. Подсчет колоний показал, что в контрольных неразрушенных образцах количество бактерий составило $4,8 \times 10^7$ КОЕ/мл, после ультразвука – $2,7 \times 10^7$ КОЕ/мл, после Френч-пресса – 1×10^7 КОЕ/мл. С помощью центрифугирования получены супернатанты, содержащие экстра- и внутриклеточные метаболиты бактерий, но не содержащие самих бактерий, спор и их обломков, что подтверждено с помощью световой микроскопии, а также высева на чашки Петри со средой РПА. Эти супернатанты лизатов бактерий использовали в экспериментах по оценке уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови лабораторных мышей.

Ранее нами показано, что предварительное воздействие на лейкоциты крови лабораторных животных определенных агентов (низкие наномолярные концентрации пероксида водорода, низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высоких частот, оранжево-красный свет) значительно снижало уровень повреждений клеточной ДНК при последующем действии агентов окислительного стресса и ал-

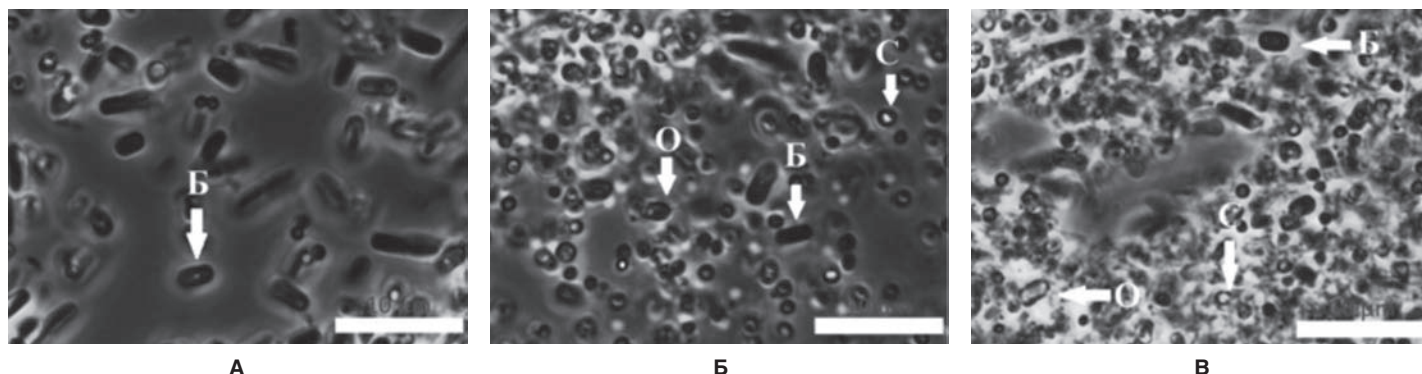


Рис. 2. Микроскопический анализ бактерий *Bacillus* sp. А – контроль (неразрушенные клетки), Б – клетки после обработки ультразвуком, В – клетки после обработки с помощью Френч-пресса. (Увеличение $\times 100$, длина шкалы 10 мкм). Обозначения: Б – бактерии, С – споры, О – обломки клеток.

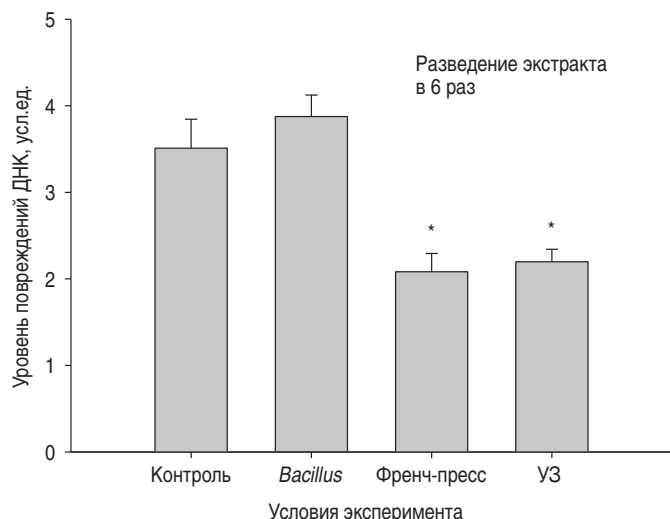


Рис. 3. Уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши после нагрузочного теста (20 мкМ пероксида водорода, 10 мин при 37°C) при инкубации клеток (20 мин при 37°C) в фосфатном буфере (контроль), супернатанте от нативных бактерий *Bacillus* sp., супернатанте от бактерий после Френч-пресса, супернатанте от бактерий после обработки ультразвуком (разведение супернатанта в 6 раз). Указаны достоверные различия по множественному критерию Даннета ($p < 0,002$), $n \geq 9$.

килирующих агентов [16, 17]. В рамках настоящего исследования проверена гипотеза о том, что предварительная обработка лейкоцитов крови метабиотиком и/или лизатом реликтовых бактерий *Bacillus* sp. способна защищать ДНК от повреждающего действия пероксида водорода путем повышения эффективности систем репарации ДНК.

Для оценки уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови лабораторных мышей линии BALB/c использовали современный метод молекулярной генотоксикологии «комета-тест» (метод ДНК-комет, comet assay) [13–18]. Метод основан на анализе картины электрофореза нуклеоидов индивидуальных клеток, ДНК которых окрашена флуоресцентным красителем. Свое название метод получил из-за визуального сходства получаемых электрофореграмм с кометами: наблюдаются яркая флуоресцирующая «голова кометы» и «хвост», образующийся в результате миграции поврежденных или расплетенных участков ДНК после электрофореза в агарозном геле.

Оценка генотоксического действия с использованием метода ДНК-комет показала, что уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши, инкубированных в присутствии супернатантов лизатов, полученных от суспензии бактерий после обработки с помощью Френч-пресса и ультразвука в выбранных режимах в течение 20 мин при 37°C, в нагрузочном тесте (пероксид водорода в концентрации 20 мкМ в течение 10 мин при 37°C) оказывается в среднем достоверно на 40% меньше по сравнению с контролем (инкубация в ФБ) и по сравнению с инкубацией в супернатанте от нативных бактерий ($p < 0,002$ по множественному критерию Даннета) (рис. 3).

Для оценки зависимости защитного эффекта от длительности экспозиции проведена серия экспериментов (при разведении супернатанта в 6 раз) с лейкоцитами крови мыши методом ДНК-комет. Оценка генотоксического действия показала, что уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши, инкубированных в присутствии супернатанта,

полученного от суспензии бактерий *Bacillus* sp. после обработки с помощью Френч-пресса и ультразвука в выбранных режимах в течение 10, 20 и 40 мин при 37°C, в нагрузочном тесте (пероксид водорода в концентрации 20 мкМ в течение 10 мин при 37°C) оказывается в среднем достоверно меньше по сравнению с контролем (инкубация в ФБ) ($p < 0,01$ по множественному критерию Даннета) (рис. 4).

Таким образом, показано наличие защитного эффекта супернатантов лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp. на ДНК лейкоцитов крови мыши при ее повреждении перокси-

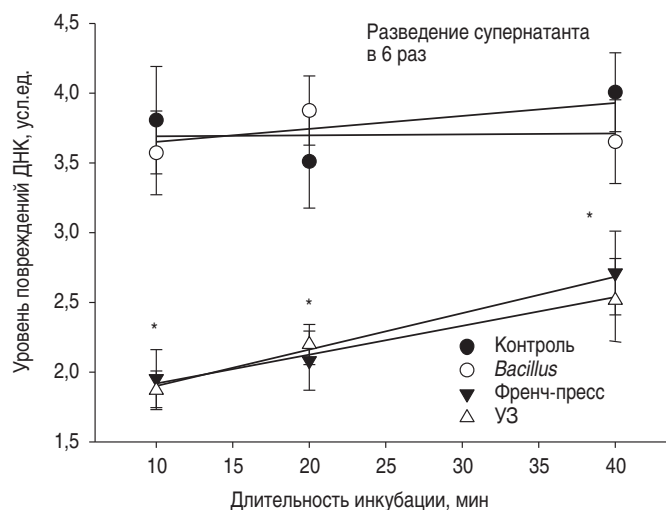


Рис. 4. Зависимость уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши после нагрузочного теста (20 мкМ пероксида водорода, 10 мин при 37°C) от длительности инкубации клеток (10–40 мин при 37°C) в фосфатном буфере (контроль), супернатанте от нативных бактерий *Bacillus* sp., супернатанте от бактерий после Френч-пресса, супернатанте от бактерий после обработки ультразвуком (разведение супернатанта в 6 раз). Указаны достоверные отличия от уровня в контроле по t-критерию Стьюдента, $p < 0,01$, $n \geq 9$.

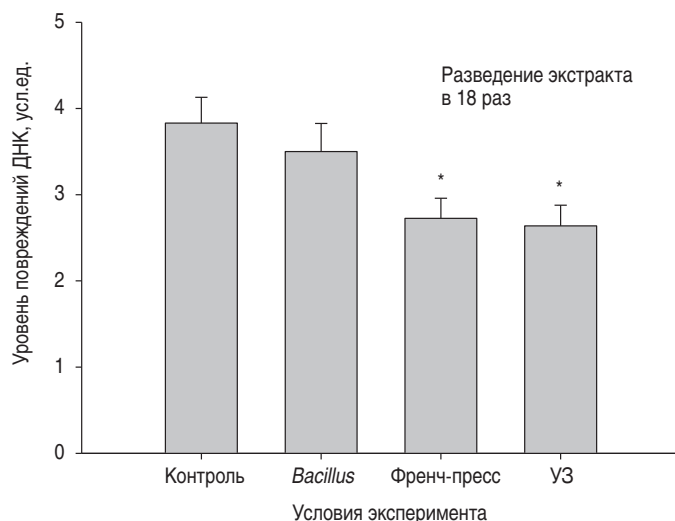


Рис. 5. Уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши после нагрузочного теста (20 мкМ пероксида водорода, 10 мин при 37°C) при инкубации клеток (20 мин при 37°C) в фосфатном буфере (контроль), супернатанте от нативных бактерий *Bacillus* sp., супернатанте от бактерий после Френч-пресса, супернатанте от бактерий после обработки ультразвуком (разведение супернатантов в 18 раз). Указаны достоверные отличия от уровня в контроле по множественному критерию Даннета, $p < 0,01$, $n \geq 9$.

дом водорода в нагрузочном тесте. Величина обнаруженного защитного эффекта линейно зависела от длительности инкубации лейкоцитов в присутствии супернатантов лизатов в течение 10–40 мин. Максимальный защитный эффект составил около 45% при длительности инкубации 10 мин в присутствии супернатантов лизатов бактерий *Bacillus* sp. (рис. 4).

Для анализа зависимости защитного эффекта от концентрации супернатантов проведена серия экспериментов (при разведении супернатантов в 18 раз) с лейкоцитами крови мыши методом ДНК-комет. Оценка генотоксического действия показала, что защитный эффект супернатантов лизатов бактерий *Bacillus* sp., разрушенных с помощью френч-пресса и импульсного ультразвука, на ДНК лейкоцитов крови мыши сохранялся при разведении супернатантов в 18 раз ($p < 0,01$ по множественному критерию Даннета) (рис. 5).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали наличие защитного эффекта экстракта реликтовых бактерий *Bacillus* sp. на ДНК лейкоцитов крови мыши при ее повреждении пероксидом водорода в нагрузочном тесте. Защитный эффект наблюдался в диапазоне кратностей разведения супернатантов лизатов бактерий от 6 до 18.

Обсуждение

Известно, что некоторые представители рода бактерий *Bacillus* (например, *B. subtilis*) являются пробиотиками. Например, в исследованиях на мышах споры *B. subtilis* оказывали иммуностимулирующий эффект при пероральном применении [19]. При применении аналогичных препаратов для кормления рыб также показано, что *B. subtilis* изменяет показатели крови и улучшает неспецифический иммунитет (non-specific immunity) [20–23]. Препараты на основе этих бактерий могут применяться в качестве замены антибиотиков при выращивании овец [24] и кур-бройлеров (broiler chickens) [25]. Другие исследователи изучали эффект иммуностимулирующих бактерий *B. licheniformis* XY-52 на рыбах grass carp [26]. С применением хроматографии и последующей перекристаллизации авторами были получены два очищенных метаболита Cyclo (Phe-Tyr) и Cyclo (Phe-Gly). При включении в диету карпов этих добавок значительно увеличились гуморальные показатели врожденного иммунитета, кроме того, заметно возросла устойчивость к инфекциям.

Из морской воды выделен новый штамм *B. subtilis* AG4, из которого экстрагирован и выделен экзополисахарид EPSR4, демонстрирующий значительную биологическую активность [27]. На различных линиях клеточных культур человека показана антиоксидантная активность этого метаболита, противоопухолевые и противовоспалительные свойства. Препарат на основе EPSR4 может в дальнейшем использоваться в качестве вспомогательной терапии при болезни Альцгеймера. Широко распространенные бактерии рода *Bacillus* могут быть источником ряда полипептидных антибиотиков, особенно ценных для использования против патогенов человека, приобретших устойчивость к обычным антибиотикам [28, 29]. Таким образом, бактерии рода *Bacillus* могут выделять ряд ценных для человека и животных метаболитов, обладающих иммуностимулирующими, антибактериальными и антиоксидантными свойствами. Ранее показана пробиотическая активность реликтовых бактерий *B. cereus*

на мышах, зараженных бактериями *Salmonella enterica* var. *enteritidis* [30]. Эти бактерии при пероральном введении защищали мышей от инфекции, вызванной сальмонеллами. Таким образом, штамм бактерий *Bacillus* sp. в дальнейшем может быть использован в качестве пробиотика.

Задачей данного исследования было изучение действия лизатов, полученных разными способами из реликтовых бактерий *Bacillus* sp., на ДНК лейкоцитов крови мыши, поврежденной пероксидом водорода. ДНК несет генетическую информацию, которая управляет сложными биологическими процессами, и поддержание стабильного генома имеет решающее значение для индивидуального роста и развития, а также для нормального развития организма. Репарация ДНК представляет собой фундаментальный и консервативный механизм, ответственный за исправление поврежденной ДНК и восстановление стабильности генома, поэтому нарушение его функционирования тесно связано с множественными заболеваниями, особенно при старении [31]. В последние годы был достигнут заметный прогресс в области исследований репарации ДНК при геронтогенезе, что позволило сформулировать некоторые закономерности, определяющие взаимосвязь между повреждением ДНК, ее репарацией, старением и заболеваниями, связанными со старением [32]. В частности, старение отрицательно влияет на эффективность систем репарации ДНК; некачественная репарация ДНК напрямую связана со старением и ассоциированными со старением болезнями; накопление повреждений ДНК, связанное с возрастом, и начало старения образуют порочный круг. В связи с этим усиление репарации ДНК может быть общим механизмом в различных стратегиях (оздоровления) омоложения [33], продления периода мезогенеза.

Ранее были показаны ДНК-протекторные свойства ряда биоактивных молекул, например витаминов С и Е, полифенолов [34], антиоксидантов [35, 36], а также веществ, содержащихся в растительных маслах [37], в частности, орегано и тимьяна, некоторых фруктах [38] и растениях [39, 40], в том числе ферментированных микроорганизмами [41]. Многие растения могут защитить клетки от окислительного стресса [42], причем около половины таких препаратов прямо или косвенно происходят из натуральных продуктов [43].

Нами продемонстрирована заметная зависимость защитного эффекта лизатов *Bacillus* sp. на ДНК лейкоцитов крови мыши при ее повреждении пероксидом водорода в нагрузочном тесте от условий предварительного инкубирования лейкоцитов в присутствии лизатов. Полученный нами протекторный эффект сравним с действием такого известного ДНК-протектора, как тимидин [44], или специфический ДНК-связанный белок, полученный из культуры *Escherichia coli* [45], или бактериальные мини-ферритины [46].

Величина обнаруженного защитного эффекта линейно зависела от длительности инкубации в течение 10–40 мин и слабо зависела от кратности разведения супернатантов лизатов, по крайней мере в диапазоне 6–18. Интересно отметить, что величина защитного эффекта лизатов, полученных разным способом, достоверно не отличалась, хотя эффективность разрушения была значительно выше при применении Френч-пресса по сравнению с разрушением ультразвуком. Это указывает на отличие в степени дезинтеграции бактерий этими способами.

Полученные результаты не дают однозначного ответа о природе действующих факторов, которые лежат в основе защитных эффектов лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp. на ДНК клеток животных. Ответ на этот вопрос требует детального анализа биологически активных веществ, содержащихся в получаемых субстанциях, с помощью хромато-масс-спектрометрических и других современных методов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора и при финансовой поддержке субсидии из областного бюджета Тюменской области (соглашение №92-ДОН от 16 августа 2022 г.).

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор and with the financial support of epy regional budget of the Tyumen region (Contract No 92-DON of August 16, 2022).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Благодарности

Авторы благодарны Звонареву А.Н. (ИБФМ РАН) за проведение микроскопического анализа, а также Пунтус И.Ф. (ИБФМ РАН) за выполнение дезинтеграции бактерий.

Gratitude

The authors are grateful to Zvonarev A.N. (IBPhM RAS) for microscopy analysis and to Puntus I.F. (IBPhM RAS) for disintegration of bacteria.

Литература

- Clarke TC, Black LI, Stussman BJ, Barnes PM, Nahin RL. Trends in the use of complementary health approaches among adults: United States, 2002–2012. *Nat Health Stat Report*. 2015 Feb 10;(79):1-16.
- Crovesy L, Ostrowski M, Ferreira D, Rosado E, Soares-Mota M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Obes*. 2017 Nov;41(11):1607-14. DOI: 10.1038/ijo.2017.161
- Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashirdes S, et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell*. 2018 Sep 6;174(6):1406-23. e16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.047
- Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, Ginestet P, Weissenbach J, Sghir A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ Microbiol*. 2005 Aug;7(8):1104-15. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00795.x
- Greenblatt CL, Davis A, Clement BG, Kitts CL, Cox T, Cano RJ. Diversity of microorganisms isolated from amber. *Microb Ecol*. 1999 Jul;38(1):58-68. DOI: 10.1007/s002489900153
- Zhang DC, Brouchkov A, Griva G, Schinner F, Margesin R. Isolation and characterization of bacteria from ancient siberian permafrost sediment. *Biology (Basel)*. 2013 Jan 10;2(1):85-106. DOI: 10.3390/biology2010085
- Vreeland R, Rosenzweig W, Powers D. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*. 2000 Oct 19;407:897-900. DOI: 10.1038/35038060
- Johnson SS, Hebsgaard MB, Christensen TR, Mastepanov M, Nielsen R, Munch K, et al. Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 4;104(36):14401-5. DOI: 10.1073/pnas.0706787104
- Brouchkov A, Griva G, Fursova O, Fursova N, Ignatov S, Pogorelko G. Is the ancient permafrost bacteria able to keep DNA stable? *J Genet*. 2016 Dec;95(4), 1003-7. DOI: 10.1007/s12041-016-0708-0
- Brouchkov A, Melnikov V, Sukhovei Yu, Griva G, Repin V, Kalenova L, et al. Relict microorganisms of cryolithozone as possible objects of gerontology (in Russian). *Adv Gerontol*. 2011 Feb 16;1:39-44. DOI: 10.1134/S207905701101005X
- Brenner EV, Brouchkov AV, Kurilshikov AM, Griva GI, Kashuba E, Kashuba VI, et al. Draft genome sequence of *Bacillus cereus* strain F, isolated from ancient permafrost. *Genome Announc*. 2013 Aug 1;1(4):e00561-13. DOI: 10.1128/genomeA.00561-13
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1982, p. 2230.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Петерсон АМ, Глинская ЕВ, Грива ГИ, Брушков АВ, Репин ВЕ, Чернявский ВФ, Софронова ОН. Бактерии, выделенные из реликтовых мерзлых толщ Центральной Якутии. *Якутский медицинский журнал*. 2011;4:70-7.
- Domanskaya OV, Bome NA, Iashnikov AV, Vasilchenko AV, Vasilchenko AS. The multiple activities and the plant beneficial potential of *Bacillus* spp. derived from the permafrost of western Siberia. *Agronomy*. 2021 Nov 11;11(13):2347. DOI: 10.3390/agronomy11112347
- Гапеев АБ, Лукьянова НА. Импульсно-модулированное электромагнитное излучение крайне высоких частот защищает ДНК клеток от повреждающего действия физико-химических факторов *in vitro*. *Биофизика*. 2015;60(5):889-97.
- Гапеев АБ, Юршенас ДА, Манохин АА, Храмов РН. Защита ДНК лейкоцитов крови от повреждающего действия ультрафиолетового излучения при использовании стратегии "Полезное Солнце". *Биофизика*. 2017;62(3):552-8. DOI: 10.1134/S0006350917030058
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x
- Huang JM, La Ragione RM, Nunez A, Cutting SM. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jul;53(2):195-203. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00415.x
- Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, Nayak SK. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol*. 2008 Feb;24(2):168-72. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.10.008
- Wang GX, Liu YT, Li FY, Gao HT, Lei Y, Liu XL. Immunostimulatory activities of *Bacillus simplex* DR-834 to carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol*. 2010 Sep;29(3):378-87. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.03.014.
- Zhou C, Wang H, Li X, Luo Y, Xie M, Wu Z, Chen X. Regulatory effect of *Bacillus subtilis* on cytokines of dendritic cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 17;20(2):389. DOI: 10.3390/ijms20020389
- Dias DC, Tachibana L, Iwashita MKP, Nakandakare IB, Romagosa E, Seriani R, Ranzani-Paiva MJT. Probiotic supplementation causes hematological changes and improves non-specific immunity in *Brycon amazonicus*. *Acta Sci Biol Sci*. 2020 Aug; 42:e52473. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v42i1.52473
- Mousa S, Elsayed A, Marghani B, Ateya A. Effects of supplementation of *Bacillus* spp. on blood metabolites, antioxidant status, and gene expression pattern of selective cytokines in growing Barki lambs. *J Adv Vet Anim Res*. 2019 Jul 13;6(3):333-40. DOI: 10.5455/javar.2019.f351

25. Mohamed TM, Sun W, Bumbie GZ, Dosoky WM, Rao Z, Hu P, Wu L, Tang Z. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* on growth performance, organ weight, digestive enzyme activities, and serum biochemical indices in broiler. *Animals*. 2022 Jun 16;12:1558. DOI: 10.3390/ani12121558
26. Chen XM, Ru HM, Niu XT, Wang GQ, Zhang DM. Enhancement of secondary metabolites from *Bacillus licheniformis* XY-52 on immune response and expression of some immune-related genes in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & Shellfish Immunol*. 2015 Feb 19;45(1):124-31. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.02.019
27. Abdel-Wahab BA, Abd El-Kareem HF, Alzamami A, Fahmy CA, Elesawy BH, Mahmoud MM, et al. Novel exopolysaccharide from marine *Bacillus subtilis* with broad potential biological activities: Insights into antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxicity, and anti-Alzheimer activity. *Metabolites*. 2022 Jul 31;12:715. DOI: 10.3390/metabo12080715
28. Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front Microbiol*. 2019 Feb 26;10:302. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00302
29. Yahya G, Ebada A, Khalaf EM, Mansour B, Nouh NA, Mosbah RA, et al. Soil-associated *Bacillus* species: A reservoir of bioactive compounds with potential therapeutic activity against human pathogens. *Microorganisms*. 2021 May 24;9:1131. DOI: 10.3390/microorganisms9061131
30. Fursova O, Potapov V, Brouchkov A, Pogorelko G, Griva G, Fursova N, Ignatov S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against *Salmonella* infection in mice. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012 Sep;4(3):145-53. DOI: 10.1007/s12602-012-9105-z
31. Schumacher B, Pothof J, Vijg J, Hoeijmakers JHJ. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature*. 2021 Apr;592(7856):695-703. DOI: 10.1038/s41586-021-03307-7
32. Niedernhofer LJ, Gurkar AU, Wang Y, Vijg J, Hoeijmakers JHJ, Robbins PD. Nuclear genomic instability and aging. *Annu Rev Biochem*. 2018 Jun 20;87:295-322. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012239
33. Chen Y, Geng A, Zhang W, Qian Z, Wan X, Jiang Y, Mao Z. Fight to the bitter end: DNA repair and aging. *Ageing Res Rev*. 2020 64:101154. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101154
34. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernandez H, et al. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011 Jul;40(5):310-4. DOI: 10.1259/dmfr/95408354
35. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the comet assay. *Mutat Res*. 2009, Jan-Feb;681(1):51-67. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.05.002
36. Kotanoğlu MS, Kadioğlu E, Emerce E, Kaymak Ç, Özcan A, Başar H. Antioxidant effects of dexmedetomidine against hydrogen peroxide-induced DNA damage *in vitro* by alkaline comet assay. *Turk J Med Sci*. 2020 Aug 26;50(5):1393-98. DOI: 10.3906/sag-1910-76
37. Slamenová D, Horváthová E, Sramková M, Marsálková L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured *in vitro*. *Neoplasma*. 2007;54(2):108-12.
38. Soumya K, Haridas KR, James J, Kumar VBS, Edatt L, Sudheesh S. Study of *In vitro* antioxidant and DNA damage protection activity of a novel luteolin derivative isolated from *Terminalia chebula*. *J Taibah Univ Sci*. 2019 Jun 24;13(1):755-63. DOI: 10.1080/16583655.2019.1630892
39. Salar RK, Purewal SS. Phenolic content, antioxidant potential and DNA damage protection of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) cultivars of North Indian region. *Food Measure*. 2017;11:126-33. DOI: 10.1007/s11694-016-9379-z
40. Kaur P, Dhull SB, Sandhu KS, Salar RK, Purewal SS. Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) seeds: *in vitro* DNA damage protection, bioactive compounds and antioxidant potential. *Food Measure*. 2018 Mar 7;12:1530-38. DOI: 10.1007/s11694-018-9768-6
41. Salar RK, Certik M, Brezova V. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2012 Feb 01;17:109-16. DOI: 10.1007/s12257-011-0455-2
42. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. 2011 Jul;89(3):217-33. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.04.008
43. Veeresham C. Natural products derived from plants as a source of drugs. *J Adv Pharm Tech Res*. 2012 Oct;3(4):200-1. DOI: 10.4103/2231-4040.104709
44. Li Y, Guo J, Zhang H, Lam C, Luo W, Zhou H, Zhang W. Protective effect of thymidine on DNA damage induced by hydrogen peroxide in human hepatocellular cancer cells. *ACS Omega*. 2020 Aug 19;5(34):21796-804. DOI: 10.1021/ascomega.0c02843
45. Martinez A, Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol*. 1997 Aug;179(16):5188-94. DOI: 10.1128/jb.179.16.5188-5194.1997
46. Arnold AR, Barton JK. DNA protection by the bacterial ferritin Dps via DNA charge transport. *J Am Chem Soc*. 2013 Oct 23;135(42):15726-29. DOI: 10.1021/ja408760w

References

1. Clarke TC, Black LI, Stussman BJ, Barnes PM, Nahin RL. Trends in the use of complementary health approaches among adults: United States, 2002–2012. *Nat Health Stat Report*. 2015 Feb 10;(79):1-16.
2. Crovesy L, Ostrowski M, Ferreira D, Rosado E, Soares-Mota M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Obes*. 2017 Nov;41(11):1607-14. DOI: 10.1038/ijo.2017.161
3. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashirdes S, et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell*. 2018 Sep 6;174(6):1406-23. e16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.047
4. Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, Ginestet P, Weissenbach J, Sghir A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ Microbiol*. 2005 Aug;7(8):1104-15. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00795.x
5. Greenblatt CL, Davis A, Clement BG, Kitts CL, Cox T, Cano RJ. Diversity of microorganisms isolated from amber. *Microb Ecol*. 1999 Jul;38(1):58-68. DOI: 10.1007/s002489900153
6. Zhang DC, Brouchkov A, Griva G, Schinner F, Margesin R. Isolation and characterization of bacteria from ancient siberian permafrost sediment. *Biology (Basel)*. 2013 Jan 10;2(1):85-106. DOI: 10.3390/biology2010085
7. Vreeland R, Rosenzweig W, Powers D. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*. 2000 Oct 19;407:897-900. DOI: 10.1038/35038060
8. Johnson SS, Hebsgaard MB, Christensen TR, Mastepanov M, Nielsen R, Munch K, et al. Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 4;104(36):14401-5. DOI: 10.1073/pnas.0706787104
9. Brouchkov A, Griva G, Fursova O, Fursova N, Ignatov S, Pogorelko G. Is the ancient permafrost bacteria able to keep DNA stable? *J Genet*. 2016 Dec;95(4):1003-7. DOI: 10.1007/s12041-016-0708-0
10. Brouchkov A, Melnikov V, Sukhovei Yu, Griva G, Repin V, Kalenova L, et al. Relict microorganisms of cryolithozone as possible objects of gerontology (in Russian). *Adv Gerontol*. 2011 Feb 16;1:39-44. DOI: 10.1134/S207905701101005X
11. Brenner EV, Brouchkov AV, Kurilshikov AM, Griva GI, Kashuba E, Kashuba VI, et al. Draft genome sequence of *Bacillus cereus* strain F, isolated from ancient permafrost. *Genome Announc*. 2013 Aug 1;1(4):e00561-13. DOI: 10.1128/genomeA.00561-13
12. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1982, p. 2230.

13. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
14. Peterson AM, Gliinskaya EV, Griva GI, Brouchkov AV, Repin VE, Chernyavskiy VF, Sofronova ON. Bacteria isolated from relict frozen terrains of the Central Yakutia. *Yakut Medical Journal*. 2011;4:70-7. (In Russian).
15. Domanskaya OV, Bome NA, Iashnikov AV, Vasilchenko AV, Vasilchenko AS. The multiple activities and the plant beneficial potential of *Bacillus* spp. derived from the permafrost of Western Siberia. *Agronomy*. 2021 Nov 11;11(13):2347. DOI: 10.3390/agronomy11112347
16. Gapeyev AB, Lukyanova NA. Pulse-modulated electromagnetic radiation of extremely high frequencies protects cellular DNA against damaging effect of physico-chemical factors *in vitro*. *Biophysics*. 2015;60(5):732-738. (In Russian).
17. Gapeyev AB, Yurshenas DA, Manokhin AA, Khramov RN. The protection of DNA in blood leukocytes from damaging action of ultraviolet radiation using the "Useful Sun" strategy. *Biophysics*. 2017 Aug 18;62(3):444-9. DOI: 10.1134/S0006350917030058 (In Russian).
18. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x
19. Huang JM, La Razione RM, Nunez A, Cutting SM. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jul;53(2):195-203. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00415.x
20. Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, Nayak SK. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol*. 2008 Feb;24(2):168-72. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.10.008
21. Wang GX, Liu YT, Li FY, Gao HT, Lei Y, Liu XL. Immunostimulatory activities of *Bacillus simplex* DR-834 to carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol*. 2010 Sep;29(3):378-87. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.03.014.
22. Zhou C, Wang H, Li X, Luo Y, Xie M, Wu Z, Chen X. Regulatory effect of *Bacillus subtilis* on cytokines of dendritic cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 17;20(2):389. DOI: 10.3390/ijms20020389
23. Dias DC, Tachibana L, Iwashita MKP, Nakandakare IB, Romagosa E, Seriani R, Ranzani-Paiva MJT. Probiotic supplementation causes hematological changes and improves non-specific immunity in *Brycon amazonicus*. *Acta Sci Biol Sci*. 2020 Aug; 42:e52473. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v42i1.52473
24. Mousa S, Elsayed A, Marghani B, Ateya A. Effects of supplementation of *Bacillus* spp. on blood metabolites, antioxidant status, and gene expression pattern of selective cytokines in growing Barki lambs. *J Adv Vet Anim Res*. 2019 Jul 13;6(3):333-40. DOI: 10.5455/javar.2019.f351
25. Mohamed TM, SunW, Bumbie GZ, DosokyWM, Rao Z, Hu P, Wu L, Tang Z. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* on growth performance, organ weight, digestive enzyme activities, and serum biochemical indices in broiler. *Animals*. 2022 Jun 16;12:1558. DOI: 10.3390/ani12121558
26. Chen XM, Ru HM, Niu XT, Wang GQ, Zhang DM. Enhancement of secondary metabolites from *Bacillus licheniformis* XY-52 on immune response and expression of some immune-related genes in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & Shellfish Immunol*. 2015 Feb 19;45(1):124-31. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.02.019
27. Abdel-Wahab BA, Abd El-Kareem HF, Alzamami A, Fahmy CA, Elesawy BH, Mahmoud MM, et al. Novel exopolysaccharide from marine *Bacillus subtilis* with broad potential biological activities: Insights into antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxicity, and anti-Alzheimer activity. *Metabolites*. 2022 Jul 31;12:715. DOI: 10.3390/metabo12080715
28. Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front Microbiol*. 2019 Feb 26;10:302. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00302
29. Yahya G, Ebada A, Khalaf EM, Mansour B, Nouh NA, Mosbah RA, et al. Soil-associated *Bacillus* species: A reservoir of bioactive compounds with potential therapeutic activity against human pathogens. *Microorganisms*. 2021 May 24;9:1131. DOI: 10.3390/microorganisms9061131
30. Fursova O, Potapov V, Brouchkov A, Pogorelko G, Griva G, Fursova N, Ignatov S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against *Salmonella* infection in mice. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012 Sep;4(3):145-53. DOI: 10.1007/s12602-012-9105-z
31. Schumacher B, Pothof J, Vijg J, Hoeijmakers JHJ. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature*. 2021 Apr;592(7856):695-703. DOI: 10.1038/s41586-021-03307-7
32. Niedernhofer LJ, Gurkar AU, Wang Y, Vijg J, Hoeijmakers JHJ, Robbins PD. Nuclear genomic instability and aging. *Annu Rev Biochem*. 2018 Jun 20;87:295-322. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012239
33. Chen Y, Geng A, Zhang W, Qian Z, Wan X, Jiang Y, Mao Z. Fight to the bitter end: DNA repair and aging. *Ageing Res Rev*. 2020 64:101154. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101154
34. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernandez H, et al. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011 Jul;40(5):310-4. DOI: 10.1259/dmfr/95408354
35. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the comet assay. *Mutat Res*. 2009, Jan-Feb;681(1):51-67. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.05.002
36. Kotanoğlu MS, Kadioğlu E, Emerce E, Kaymak Ç, Özcan A, Başar H. Antioxidant effects of dexmedetomidine against hydrogen peroxide-induced DNA damage *in vitro* by alkaline comet assay. *Turk J Med Sci*. 2020 Aug 26;50(5):1393-98. DOI: 10.3906/sag-1910-76
37. Slamenová D, Horváthová E, Sramková M, Marsálková L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured *in vitro*. *Neoplasma*. 2007;54(2):108-12.
38. Soumya K, Haridas KR, James J, Kumar VBS, Edatt L, Sudheesh S. Study of *In vitro* antioxidant and DNA damage protection activity of a novel luteolin derivative isolated from *Terminalia chebula*. *J Taibah Univ Sci*. 2019 Jun 24;13(1):755-63. DOI: 10.1080/16583655.2019.1630892
39. Salar RK, Purewal SS. Phenolic content, antioxidant potential and DNA damage protection of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) cultivars of North Indian region. *Food Measure*. 2017;11:126-33. DOI: 10.1007/s11694-016-9379-z
40. Kaur P, Dhull SB, Sandhu KS, Salar RK, Purewal SS. Tulsī (*Ocimum tenuiflorum*) seeds: *in vitro* DNA damage protection, bioactive compounds and antioxidant potential. *Food Measure*. 2018 Mar 7;12:1530-38. DOI: 10.1007/s11694-018-9768-6
41. Salar RK, Certik M, Brezova V. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2012 Feb 01;17:109-16. DOI: 10.1007/s12257-011-0455-2
42. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. 2011 Jul;89(3):217-33. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.04.008
43. Veeresham C. Natural products derived from plants as a source of drugs. *J Adv Pharm Tech Res*. 2012 Oct;3(4):200-1. DOI: 10.4103/2231-4040.104709
44. Li Y, Guo J, Zhang H, Lam C, Luo W, Zhou H, Zhang W. Protective effect of thymidine on DNA damage induced by hydrogen peroxide in human hepatocellular cancer cells. *ACS Omega*. 2020 Aug19;5(34):21796-804. DOI: 10.1021/ascomega.0c02843
45. Martinez A, Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol*. 1997 Aug;179(16):5188-94. DOI: 10.1128/jb.179.16.5188-5194.1997
46. Arnold AR, Barton JK. DNA protection by the bacterial ferritin Dps via DNA charge transport. *J Am Chem Soc*. 2013 Oct 23;135(42):15726-29. DOI: 10.1021/ja408760w

Информация о соавторах:

Аверин Михаил Вячеславович, ведущий инженер-исследователь АНО «Губернская академия»

Бородулин Максим Борисович, ведущий инженер-исследователь АНО «Губернская академия»

Гапеев Андрей Брониславович, доктор физико-математических наук, профессор Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Грива Геннадий Иванович, доктор геолого-минералогических наук, ведущий инженер-исследователь АНО «Губернская академия»

Захарченко Наталья Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Мельников Владимир Павлович, доктор геолого-минералогических наук, академик РАН, главный научный сотрудник отдела методологии междисциплинарных исследований криосферы Института криосферы Земли – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр» СО РАН

Потапов Василий Дмитриевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела переподготовки и усовершенствования специалистов ФБун «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рукавцова Елена Борисовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Храмов Роберт Николаевич, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН

Щербатюк Татьяна Григорьевна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник ФБун «Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора

Брушков Анатолий Викторович, доктор геолого-минералогических наук, заведующий кафедрой геокриологии геологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»

Information about co-authors:

Mikhail V. Averin, Leading Research Engineer, Autonomous non-profit organization «Provincial Academy»

Maxim B. Borodulin, Leading Research Engineer, Autonomous non-profit organization «Provincial Academy»

Andrey B. Gapeev, PhD, DSc (Phys.-Math.), Professor, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences»

Gennady I. Griva. PhD, DSc (Geol.), Leading Research Engineer, Autonomous non-profit organization «Provincial Academy»

Natalya S. Zakharchenko, PhD (Biol.), Senior Researcher of the Branch of the Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS

Vladimir P. Melnikov, PhD, DSc (Geol.), Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher of the Department of Methodology for Interdisciplinary Cryosphere Research, Institute of Earth Cryosphere Tyumen Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Vasily D. Potapov, PhD, DSc (Biol.), Chief Researcher of the Department of Retraining and Improvement of Specialists of the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Elena B. Rukavtsova, PhD, DSc (Biol.), Senior Researcher, Branch of the Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS

Robert N. Khramov, PhD (Phys.-Math.), Leading Researcher, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences

Tatyana G. Shcherbatyuk, PhD, DSc (Med.), Chief Researcher, Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology of Rosпотребнадзора

Anatoly V. Brushkov, PhD, DSc (Geol.), Head of the Department of Geocryology, Faculty of Geology, Lomonosov Moscow State University

Эхинококкоз на юге России: эпидемиологические и эпизоотологические аспекты

Эхинококкоз человека – тяжелое паразитарное заболевание, вызываемое личиночной стадией *Echinococcus granulosus* и имеющее важное социально-экономическое значение.

Цель. Изучение и анализ современной эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по эхинококкозу на юге России.

Материалы и методы. Проведены анализ заболеваемости эхинококкозом населения юга России и сероэпидемиологическое обследование 5404 жителей. Выполнен анализ карт эпидемиологического обследования случаев заболевания эхинококкозом на территории Карачаево-Черкесской Республики (КЧР). Изучена экстенсивность и интенсивность инвазии эхинококками собак, сельскохозяйственных и диких животных.

Результаты. Наиболее высокие показатели заболеваемости населения страны эхинококкозом регистрируются на территориях Северо-Кавказского федерального округа. Анализ карт эпидемиологического обследования в КЧР показал, что на долю взрослого населения пришлось 74,5% случаев. У 76,4% больных в частных домовладениях были сельскохозяйственные животные; 73,9% больных содержали собак, регулярная дегельминтизация которых отсутствовала. Данные анализа карт эпидемиологического обследования согласуются с результатами исследований экстенсивности и интенсивности инвазии эхинококками сельскохозяйственных животных и собак на территории КЧР. Серологическое обследование условно здорового населения показало целесообразность применения иммуноферментного анализа на эндемичных территориях для ранней диагностики эхинококкоза, а также для изучения доли населения, контактирующего с возбудителем инвазии.

Заключение. Проблема эхинококкоза на юге России остается актуальной и требует пристального внимания специалистов лечебной сети и санитарно-эпидемиологической службы в плане своевременного выявления, лечения и профилактики данного заболевания.

Твердохлебова Т.И., Ковалев Е.В., Карпущенко Г.В., Болатчиев К.Х., Думбадзе О.С., Хуторянина И.В., Черникова М.П., Димидова Л.Л., Шемякова С.А., Черниговец Л.Ф.
Инфекционные болезни. 2022; 20(2): 68–74. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-68-74
Источник: <https://www.phdynasty.ru>