**Популяционный уровень кишечных пробиотических бактерий и фекальные мутагены**

**И.С.Савицкая**

Казахский национальный университет им. аль-Фараби

В организме человека в результате химического взаимодействия между определенными соединениями, входящими в состав пищи, или их метаболической активации в некоторых случаях могут синтезироваться мутагены [1,7,15]. Образование мутагенных продуктов из исходных веществ возможно и в процессе их микробной трансформации [3, 12]. Такой процесс может происходить при нарушении микробной экологии кишечника, поскольку участие дисбиотической микробиоты в канцерогенезе подтверждено многими экспериментальными данными. Усиленный синтез таких бактериальных ферментов как α- и β-глюкозидаза, β-глюкуронидаза, 7-α дегидроксилаза, 7-α-стероиддегидрогеназа, нитроредуктаза, азоредуктаза активизирует реакции преобразования многих проканцерогенов в канцерогены. Эти ферменты эффективно продуцируют клостридии, бактероиды, вейллонеллы, эшерихии, актиномицеты, гемофильные бактерии [1,6]. На самом деле, спектр метаболической активности этих микроорганизмов значительно шире, что позволяет им воздействовать на многие субстраты, попадающие в организм человека из окружающей среды, а также эндогенного происхождения, с образованием разнообразных мутагенов и канцерогенов.

В то же время нормальная микрофлора кишечника принимает участие в обезвреживании мутагенов за счет ферментативного воздействия и продукции антимутагенов. Установлена антимутагенная и противоопухолевая активность клеток или фрагментов клеточных компонентов лактобацилл, бифидобактерий, пропионовокислых бактерий, энтерококков и их метаболитов, присутствующих в культуральной жидкости или в ферментированных продуктах [2,9,18]. Противоопухолевые свойства пробиотической флоры основаны как на стимуляции ими противоопухолевого иммунитета, так и на прямом токсическом воздействии их клеток и метаболитов на новообразования [4,14,17]. При этом не стоит игнорировать имеющиеся единичные сведения о том, что избыточное количество бифидобактерий в кишечнике может быть сопряжено с риском развития колоноректального рака, ассоциированного с повышенной β-глюкозидазной, β-глюкуронидазной и азоредуктазной активностью при щелочной реакции среды, что может происходить при переходе от растительной к мясной диете [1,6]. Если это так, то изменение популяционного уровня представителей облигатной кишечной флоры может приводить к снижению или увеличению мутагенности фекальных масс. Ранее генотоксичность фекалий определяли либо по наличию в них мутагенов после введения таковых экспериментальным животным, либо оценивали мутагенный фон фекальных экстрактов, полученных от контингента лиц, предпочитающих мясную или вегетарианскую диету [8-13]. Содержание же фекальных мутагенов при микроэкологических нарушениях кишечника до сих пор не исследовано. Дисбиозы кишечника, как правило, характеризуются снижением популяционного уровня бифидобактерий и лактобацилл [1].

**Цель исследования** - определение мутагенного фона экстрактов фекалий при стандартном и сниженном популяционном уровне бифидобактерий, лактобацилл и кишечных палочек.

**Материалы и методы**

В работе были использованы фекальные экстракты, полученные от 52 человек, у которых предварительно проводили бактериологический анализ микробного пейзажа фекалий по стандартной методике [1]. Для приготовления экстрактов из кишечного содержимого в качестве экстрагента использовали дистиллированную воду, добавляемую к свежему образцу, содержащемуся в стерильном пенициллиновом флаконе, в соотношении 2:1. Содержимое флакона растирали стеклянной палочкой, измельчали в блендере, отстаивали 10-15 мин, полученную суспензию центрифугировали 20 мин при 50 000 g. Надосадочную жидкость отбирали в отдельный флакон, осадок снова подвергали экстракции по указанной схеме. Смесь стерилизовали мембранным фильтрованием через фильтры диаметром 0,45 мкм, затем 0,22 мкм.

Для приготовления фекалазы (ферментативных экстрактов фекалий) образцы, собранные от 5 здоровых и 6 доноров с дефицитом лактофлоры обрабатывали в лаборатории не позднее, чем через полчаса после акта дефекации [16]. Фекалии суспендировали в 10 mM Na-фосфатном буфере в соотношении 1:1 или 1:3 (вес:объем) в зависимости от консистенции. Для получения бесклеточного ферментативного экстракта и лизиса бактериальных клеток, присутствующих в полученной суспензии, их разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40 сек при охлаждении (в ледяной бане) на дезинтеграторе УЗДН-1. Фрагменты клеток удаляли центрифугированием при 30 000 g 20 мин при 40С на ультрацентрифуге UP-65 (Германия). Сохранение нативной ферментативной активности в экстрактах определяли с помощью общепринятого теста на β-галактозидазу. Поскольку количество этого фермента в индивидуальных образцах значительно варьировало, экстракты смешивали, чтобы получить объединенный ферментативный экстракт фекалий, которые стерилизовали ультрафильтрацией и хранили при - 700 С.

**Тестирование на мутагенность** проводили в модифицированом тесте Эймса с индикаторными штаммами Salmonella typhimurium ТА-98 и ТА-100 [5]. Штаммы несут мутацию ауксотрофности по гистидину и ревертируют под действием мутагенов, вызывающих мутации типа сдвига рамки считывания (штамм ТА 98) или замены пар оснований в молекуле ДНК (штамм ТА 100). Принцип метода состоит в том, что под действием мутагена на селективной среде вырастают ревертанты по гистидину, по числу которых определяют мутагенный эффект. Принято считать, что таковой имеет место в случае, если уровень индуцированных тестируемым агентом реверсий более чем в 2 раза превосходит спонтанный фон мутирования используемого штамма [7]. Суспензию клеток тест-штамма предварительно инкубировали с опытным вариантом в течение 2 час при 370, затем клетки отмывали от него и высевали на чашки с селективной средой. В качестве потенциальных промутагенных субстратов или мутагенов для позитивных контролей использовали: N-нитрозо-N´-нитро-нитрозогуанидин (НГ) - 1 мкг/мл; N-нитрозо-N-метилмочевину (НММ) – 100 мкг/мл (фирмы Sigma, США); 3-амино-1,4-диметил-[5Н]-пиридин-[4,3] индол (Trp-P), приготовленный из пиролизатов триптофана.

**Статистическая обработка.**Для решения вопроса о наличии связи между снижением количества защитной микрофлоры и мутагенной активностью фекалий применяли корреляционный анализ. Рассматриваемые в данном случае признаки являются качественными так как они не распределяются в вариационный ряд и имеют только два противоположных нечисловых значения, которые удобно обозначить их «+» и «**-**». Тогда учитываемые признаки группируются в 4-х клеточную корреляционную решетку, а степень их сопряженности измеряется с помощью коэффициента ассоциации Дж. Юла rа, вычисляемого на основе данных опыта.Коэффициент ассоциации может принимать значения от –1 до 1. Если rа<0-корреляция отрицательная, если rа>0-корреляция положительная. Чем ближе абсолютное значение rа к 1, тем сильнее корреляция. Для оценки достоверности эмпирического коэффициента ассоциации вычисляют его отношение к средней ошибке m, которое должно быть больше стандартного значения критерия t Стьюдента для данного числа степеней свободы k = n-2 и уровня значимости Р.

**Результаты**

Полученные вышеописанным способом водные экстракты фекалий добавляли в количестве 0,5 мл на чашку; для определения спонтанного уровня мутирования к суспензии клеток тест-штаммов, высеваемых на селективную среду, добавляли аликвоты дистиллированной воды. Этим способом была исследована мутагенная активность фекальных экстрактов, полученных от 52 человек, у которых предварительно был проанализирован качественный и количественный состав кишечного микробиоценоза. Анализ их микробных карт позволил разделить обследуемый контингент на две группы. В первой группе, состоящей из 12 человек, не было зарегистрировано отклонений от принятого стандарта содержания основных представителей резидентной микрофлоры. Во второй группе, состоящей из 40 человек, были выявлены микроэкологические нарушения, проявляющиеся в снижении на 1-3 порядка логарифма популяционного уровня бифидобактерий и/или лактобацилл, уменьшении общего количества кишечных палочек и появлении их измененных форм.

При исследовании на мутагенность экстрактов фекалий, взятых от 12 человек, включенных в 1 группу, мутагенная активность выявлена только в 1 экстракте при использовании штамма ТА 100 и 2-х для штамма ТА 98 (таблица 1). Причем, даже обнаруженная слабая мутагенная активность, когда максимальное число ревертантов в образцах экстрактов превосходило их уровень в чистом контроле, находилась почти на нижней границе статистической значимости различий.

**Таблица 1. Мутагенность фекальных экстрактов для индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium***

|  |  |
| --- | --- |
| Состояниекишечной микрофлоры | Мутагенная активность экстрактов, выявленная на штамме S.typhimurium |
| ТА100\* | ТА98\* |
| Нормобиоценоз | 1/12 | 2/12 |
| Дисбактериоз | 28/40 | 36/40 |

Примечание\* в числителе указано количество проб, содержащих мутагены;

в знаменателе – общее количество протестированных экстрактов

Иная картина наблюдается во второй группе. При исследовании мутагенности фекалий от 40 пациентов с дисбактериозом, генотоксиканты, индуцирующие повышенный уровень реверсий у штамма ТА 100 обнаружены в 28 из них, и только в четырех отсутствовали мутагенные агенты, действующие по механизму сдвига рамки считывания, которые удается зарегистрировать при помощи штамма ТА 98.

Далее с использованием штамма ТА 100 отдельно исследована мутагенность экстрактов фекалий в случае дефицита трех доминирующих групп кишечных бактерий – бифидобактерий, лактобацилл и кишечных палочек (рис.).

 В состоянии нормобиоценоза мутагенность обнаружена только в 1 из 12 (8,3% случаев) исследованных экстрактов. При дефиците бифидобактерий и лактобацилл (снижении популяционного уровня на 2 и более порядков) мутагенная активность обнаружена в 15 случаев из 23 (65%). Среднее количество ревертантов, обнаруживаемое у бактерий индикаторного штамма сальмонелл ТА-100 в присутствии фекальных экстрактов, взятых от людей с дефицитом бифидобактерий, составляло 480 ревертантов/чашку, лактобацилл – 360 ревертантов/чашку, а при совместном снижении их количества – 580 ревертантов /чашку, что соответственно в 5,6; 4,2 и 6,4 раза превышало естественный фон мутабильности индикаторного штамма. Содержание мутагенов в этих фекальных экстрактах было в 4,8; 3,6 и 5,2 раз больше, чем в экстрактах из фекалий людей со стандартным популяционным уровнем бифидобактерий и лактобацилл.

**Рис. Содержание мутагенов в кишечнике при стандартном и сниженном популяционном уровне бифидобактерий, лактобацилл и эшерихий**

*Обозначения: ЛБ-лактобациллы; ББ-бифидобактерии; КП-кишечные палочки.*

При дисбалансе эшерихиозной микрофлоры мутагенность выявлена в 5 из 17 (30%) исследованных экстрактах. Однако уровень мутаций у индикаторного штамма лишь в 2,5 раза больше спонтанного фона мутирования при снижении на 1-2 порядка общего количества полноценных кишечных палочек и в 2,2 раза превосходит его при повышенном содержании в популяции измененных форм эшерихий (слабоферментирующих и лактозонегативных). Количество ревертантов в этих вариантах статистически не отличалось от данных, полученных при определении мутагенности экстрактов фекалий с нормальным уровнем эшерихиозной микрофлоры.

Для установления причинно-следственной связи между состоянием кишечной микрофлоры и содержанием мутагенных соединений в фекалиях человека, полученные данные были подвергнуты корреляционному анализу. Корреляции между качественным и количественным составом эшерихиозной микрофлоры и мутагенной активностью экстрактов фекалий не обнаружено, коэффициент ассоциации во всех случаев мал и его отличие от нуля можно отнести к случайным. Однако существует достаточно тесная корреляция между популяционным уровнем лактобацилл и бифидобактерий и уровнем фекальных мутагенов. Коэффициент ассоциации для этих двух признаков оказался равным –0,41. Знак «минус» указывает на то, что корреляция отрицательная, т.е. в случае, когда количество бифидобактерий и лактобацилл у данного обследуемого соответствует норме, то мутагенная активность фекалий скорее всего не будет выявлена. Напротив, при снижении количества бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике будет иметь место повышение содержания мутагенов в фекалиях. Отношение коэффициента ассоциации, вычисленного на основании полученных нами данных, к его средней ошибке mr больше стандартного значения критерия t Стьюдента для k = 38 и Р = 0,01,что говорит о его достоверности. Ни у одного из обследованных не наблюдался избыточный бактериальный рост каких-либо представителей условно патогенной микрофлоры, что могло бы обусловить продукцию мутагенных соединений в толстом кишечнике. Поэтому увеличение содержания генетически активных соединений в данном случае определяется дефицитом бифидобактерий и лактобацилл непосредственно, а не косвенно, через увеличение численности эшерихиозной микрофлоры.

Чтобы проверить это, из фекалий 6 человек с дисбактериозом, у которых был выявлен дефицит бифидобактерий и лактобацилл специальным образом был приготовлен ферментативный бесклеточный экстракт – фекалаза дефицит (**Фд**). Такой же экстракт получен и из фекалий людей с нормальной микрофлорой - фекалаза норма (**Фн**). Эти экстракты инкубировали в течение 2 часов с растворами модельных мутагенов, далее добавляли к индикаторным штаммам, у которых определяли уровень индуцированных ими мутаций. Результаты этих экспериментов представлены в таблице 2.

Таблица 2. **Мутагенная активность N-нитрозо-N-метилмочевины (НММ) и N-нитрозо-N-нитро-нитрозогуанидина (НГ) и пиролизата триптофана (Тrp-P) после преинкубации с фекалазой.**

|  |  |
| --- | --- |
| Штамм и модельный мутаген | Число гистидиновых ревертантов / чашку |
| Без мутагена (спонтанный фон) | С мутагеном (позитивный контроль)  | Мутаген + Фн | Мутаген + Фд |
| ТА100 - НММ | 125±9 |  1400±53 | 436±25 | 1230±36 |
| ТА 98 - НГ | 42±5 | 432±12 | 215±16 | 354±22 |
| ТА 98 - Trp-P | 37±4 | 608±32 | 580±38 | 600±44 |

Оказалось, что ферментативные экстракты, полученные из фекалий со сниженным количеством бифидобактерий и лактобацилл - Фд, практически не оказывают антимутагенного действия в отношении НММ и НГ, в то время как в присутствии препарата фекалазы, приготовленной из кишечного содержимого со стандартным популяционным уровнем этих бактерий - Фн, мутагенная активность НММ снижалась в 3,2 раза и вдвое для НГ. Уровень мутагенного эффекта пиролизата аминокислоты триптофана (Тrp-P) не изменялся в присутствии обеих вариантов фекалазы и практически не зависел от того, какое количество бифидобактерий и лактобацилл находилось в кишечных пробах.

**Обсуждение**

Бактериям, постоянно обитающим в кишечнике человека, достаточно часто приходиться контактировать с мутагенами, которые либо уже содержатся в пище, либо образуются в результате ферментативной метаболической активации промутагенов, причем осуществляемой не только самим хозяином, но и его микрофлорой. Поэтому в процессе длительного существования в таком биотопе они приобрели эффективные системы антимутагенной защиты. Поскольку доминирующим звеном кишечной микроэкологии являются бифидобактерии и лактобациллы, именно эти микроорганизмы должны обладать такими функциями, ведь именно антимутагенные способности позволяют им поддерживать постоянный и эволюционно выработанный уровень мутабильности. Тогда становится понятным, почему уменьшение популяци этих бактерий может привести к повышению мутагенного фона в кишечнике, что продемонстрировано приведенными в данной работе экспериментальными данными.

К настоящему времени известно, что бидобактерии и лактобациллы, вегетирующие в кишечнике, обладают системой многоуровневой защиты от самых различных мутагенов [2]. Микроорганизмы могут продуцировать ферменты, оказывающие антиоксидантное действие или инактивирующие мутагены, блокировать метаболическую активацию их, активизировать работу репарационных систем клетки и многое другое. Наблюдаемое в эксперименте снижение мутагенной активности N-нитрозо-N-метилмочевины и N-нитрозо-N-нитро-нитрозогуанидина после преинкубации их с фекалазой свидетельствует о том, что бифидобактерии и лактобациллы имеют ферменты, действие которых приводит к снижению индуцированного этими мутагенами уровня индуцированных реверсий у индикаторных штаммов. Это может быть связано с действием бактериальных редуктаз, восстанавливающих мутагены до гидроксиламинов [9]. Есть данные, что процессы, происходящие при гидролизе микроорганизмами соответствующих субстратов масляной кислоты влияют на инактивацию пищевых проканцерогенов, таких как нитрозамины, которые обычно образуются в результате метаболической активности бактерий-комменсалов у людей, употребляющих богатую белком пищу [13]. Впрочем, необязательно в качестве бактериальных антимутагенов могут выступать белки-ферменты. Дезактивация нитрозогуанидина, например, может быть связана с тиоловыми соединениями [2].

Не только бактериальные метаболиты, но и клетки симбиотических бактерий, проявляют высокую дисмутагенную активность в отношении мутагенов широкого спектра действия. К ним относятся так называемые пиролизатные мутагены, выделенные первоначально из жаренных, богатых белками продуктов. Бактерии резидентной кишечной микрофлоры, такие как лактобациллы, обладают способностью связывать мутагенные продукты пиролиза триптофана, образующиеся при термической обработке пищи [18]. Причем, связывают этот мутагенный продукт даже нежизнеспособные клетки. Это объясняет, почему при обработке пиролизата триптофана фекалазой, представляющей собой бесклеточный фекальный ферментативный экстракт, не происходило снижения его мутагенной активности. В связи с этим перспективным представляются не только скрининговые исследования по поиску активных штаммов, но и работы, направленные на выяснение механизмов действия и идентификацию бактериальных метаболитов, обуславливающих антимутагенный эффект. Это позволит провести обоснованный отбор пробиотических бактерий, способных оздоравливать микрофлору кишечника и наделять ее широким спектром протекторных свойств, включая антимутагенную и антикацерогенную активности.

**Литература**

1. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М.:Гэотар-Медиа.2007.- 304с.

2. Воробьева Л.И., Абилев С.К. Антимутагенные свойства бактерий (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 2002, 38(2):115-127.

3. Дурнев А.Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания. Генетика, 1997, 2 (33): 65-176.

4. Николаева Т.Н., Зорина В.В., Бондаренко В.М. Иммуномодулирующая и антиканцерогенная активность нормальной микрофлоры кишечника. Эксперим. клин. гастроэнтерол. 2004, 4:54-59.

5. Фонштейн Л.М., Абилев С.К., Бобринев Е.В. и др. Методы первичного выявления генетической активности среды с помощью бактериальных тест – систем. Методические указания. М., Наука.1985.

6. Шендеров Б.А. Микроэкологические аспекты канцерогенеза. Антибиотики и химиотерапия. 1990,.35 ( 3):165-170.

7. Ames B.N. Mutagenesis and carcinogenesis: exogenous and endogenous factors. Environ. Mol. Mutagen.1989, 14(16): 66-77.

8. Gerniglia C.E., Howard P.C., Fu P. et al. Metabolism of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons by human intestinal microflora. Bochem.Biophys.Res.Com. 1984, 123 (1):262-270.

9. Hosono A., Sagae S., Tokita E. Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induced mutagenesis in Escherichia celli B/r WP2 trp- hcr. Milchwissnscahaft. 1986, 41(3): 142-145.

10. Kingston D.G., Van Tassel R.L., Wilkins T.D. The fecapentaenes, potent mutagens from human feces. Chem. Res. Toxicol.1990, 3: 391-400.

11. Kuhnlein U., Bergstrom D., Kuhnlein H. Mutagens in feces from vegetarians and non vegetarians. Mut. Res. 1981, 85(1):1-12.

12.Moore W.E., Moore L.H. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. Appl. Environ. Microb.1995, 9(61):3202-3207.

13. Mower R.F., Ichinotsubo D., Wang L.W. et al. Fecal mutagens in two Japanese population with different colon cancer risk. Cancer Res.1982, 42(3): 1164-1169.

14. Reddy B.S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumors. J. Nutr. (Suppl.). 1999, 129: 1478- 1482.

15. Sigimura T. Food ad source of complex mixtures and carcinogens. WHO. Int. Agency Res. Cancer. (Lyon). 1990, P.399-407.

16.Tamura G., Gold C., Ferro-Luzzi A., Ames B.N. Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980, 77(8): 4961-4965.

17. Wollowski I., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am. J. Clin. Nutr. 2001, 73: 451-455.

18. Zhang X.B., Ohta Y. Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagenic pyrolizates. J. Dairy Scince, 1990, 73 (10):2702-2710.

**Аннотация**

С помощью бактериальной тест-системы Эймса на штаммах *Salmonella typhimurim* TA 100 и ТA 98 исследована мутагенная активность фекальных экстрактов, полученных от 52 человек, у которых предварительно бактериологическим методом был проанализирован качественный и количественный состав кишечного микробиоценоза. Анализ микробных карт позволил разделить обследуемый контингент на две группы, первую, состоящую из 12 человек, без выраженных отклонений от принятого стандарта содержания основных представителей резидентной микрофлоры, и вторую из 40 человек с выявленным снижением на 1-3 порядка популяционного уровня бифидобактерий, лактобацилл и кишечной палочки.

Показано, что снижение на 2-3 раза логарифма стандартного количества бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике приводит к повышению мутагенного фона экстрактов фекалий. Связи между качественным и количественным составом эшерихиозной микрофлоры и мутагенной активностью экстрактов фекалий не установлено. Ферментативные экстракты фекалазы, полученные из фекалий с высоким содержанием бифидобактерий и лактобациллп значительно снижали выраженный мутагенный эффект нитрозометилмочевины и нитрозогуанидина.