

**Юнес Роман Абдаллаевич**

**АДАПТИВНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА БАКТЕРИЙ РОДА  
*LACTOBACILLUS* И РОДА *BIFIDOBACTERIUM***

Специальность

03.02.08 – экология

03.02.07 - генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ».

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор **ОРЛОВА Валентина Сергеевна**, кафедра системной экологии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов

доктор биологических наук **ПОЛУЭКТОВА Елена Ульриховна**, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор **ЛИВШИЦ Виталий Аркадьевич**, ведущий научный сотрудник НИИ Аджиномото-генетика (ЗАО «АГРИ»), г. Москва.

доктор биологических наук, профессор **БЛИНКОВА Лариса Петровна**, заведующая лабораторией микробиологических питательных сред ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» г. Москва.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный Научный Центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук.

Защита состоится «2» марта 2017 г. в 16 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.203.38 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 115093, г. Москва, Подольское шоссе, д. 8/5, экологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан: «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Е.А. Ванисова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), эпидемией 21 века стал стресс. Возрастание стрессовой нагрузки связано с ухудшением экологической обстановки, высокой плотностью населения в мегаполисах, нездоровым питанием и другими факторами. Стресс вызывает выброс надпочечниками гормонов (адреналина, норадреналина, кортизола и др.). Физиологический смысл этого явления – инициация реакции “борьба или бегство”, чтобы преодолеть опасность (Arun, 2004).

Изучению адаптации человека к стрессу уделяется большое внимание (McEwen, 2007). Постоянное воздействие раздражителя (хронический стресс) на организм человека может привести к таким расстройствам здоровья как депрессия, тревожное состояние, синдром хронической усталости и др. В результате, по всему миру это стало серьёзной медицинской и экономической проблемой. Для лечения возникающих расстройств настроения и невротических расстройств применяют психотерапию или/и лекарственные препараты (анксиолитики – бензодиазепины, антидепрессанты – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина). Лекарства, несмотря на свою эффективность, имеют ряд недостатков. Новыми средствами лечения и профилактики невротических расстройств, вызванных стрессами, являются бактериальные пробиотические препараты – психобиотики.

Совокупность населяющих тело человека микроорганизмов (преимущественно бактерий) - микробиота - играет чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности организма (Nicholson et al., 2012). Бактерии кишечной микробиоты участвуют не только в регуляции общего метаболизма и иммунитета, но и в функционировании нервной системы хозяина (Costa et al., 2000; Cryan, Dinan, 2012; Федорова, Даниленко, 2014). Кишечный микробиом рассматривается в настоящее время как часть т.н. оси кишечник – мозг (gut-brain axis) – двунаправленной коммуникационной системы, обеспечивающей сложное функционирование ЦНС и ЖКТ (Clarke et al., 2013; Carabotti et al., 2015; Bravo et al., 2011). Отдельные штаммы пробиотических бактерий способны положительно влиять на эмоциональное поведение, восприятие боли и стресс у лабораторных животных (Dinan et al., 2013) и даже людей (Rao et al., 2009; Messaoudi et al., 2011). В настоящее время актуальной задачей является разработка подходов к поиску психобиотиков – штаммов культивируемых бактерий, преимущественно лактобацилл и бифидобактерий, оказывающих благоприятный эффект на здоровье, настроение и поведение людей при лечении нервных расстройств.

Взаимодействие бактерий кишечной микробиоты и нервной системы организма хозяина осуществляется посредством синтезируемых бактериями низкомолекулярных веществ, нейромедиаторов и гормоноподобных веществ; к ним относятся ацетилхолин и

другие холины, серотонин, норадреналин, гистамин и другие амины, жирные кислоты с короткими цепями, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) (Wall et al., 2015). Изучение веществ, осуществляющих взаимодействие бактерий кишечной микробиоты и организма человека, позволит понять механизм взаимодействия и разработать принципы создания таргетных пробиотических препаратов.

ГАМК является универсальным веществом, синтезируемым животными, растениями и бактериями (Рощина, 2004; Ueno, 2000). Катехоламины – это группа соединений, выполняющих роль посредников (медиаторов и нейрого르몬ов) в организме млекопитающих; есть данные о влиянии катехоламинов на жизнедеятельность патогенных бактерий (Freestone et al., 1998; O'Donnell et al., 2014; Sandrini et al., 2014). Синтез ГАМК пробиотическими бактериями родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, выделенными из организма людей, и их способность реагировать на присутствие катехоламинов практически не охарактеризованы.

### **Цель работы**

Изучение адаптивной способности различных штаммов лактобацилл и бифидобактерий, выделенных от человека, синтезировать гамма-аминомасляную кислоту и реагировать на присутствие катехоламинов.

### **Задачи**

- 1) Провести видовую идентификацию 32 штаммов лактобацилл, выделенных из трёх биотопов (ротовая полость, кишечник и влагалище) жителей центрального региона России.
- 2) Определить способность к синтезу ГАМК у коллекции штаммов лактобацилл и бифидобактерий, изолированных из организма жителей центрального региона России.
- 3) Охарактеризовать *gad*-гены, контролирующие синтез ГАМК, у нескольких штаммов лактобацилл и бифидобактерий – перспективных как пробиотики, отобранных по способности синтезировать ГАМК и другим пробиотическим свойствам.
- 4) Выяснить влияние катехоламинов (дофамина, норадреналина, адреналина) и серотонина на рост штаммов лактобацилл и бифидобактерий. Для одного из отобранных штаммов – потенциального пробиотика – изучить экспрессию *gad*-генов, а также влияние норадреналина на транскрипционную активность генов.
- 5) Оценить влияние штамма, отобранного по способности синтезировать ГАМК и пробиотическим свойствам, на уровень ГАМК и пролактина в крови лабораторных животных в условиях холодового шока.

### **Научная новизна работы**

- 1) Впервые проведено широкомасштабное исследование способности различных штаммов лактобацилл и бифидобактерий, выделенных от жителей центрального региона Российской Федерации, к синтезу ГАМК; показано, что это свойство является преимущественно видоспецифичным и присуще видам *L. plantarum*, *L. brevis*, *B. angulatum*, *B. adolescentis* и *B. dentium*.
- 2) Впервые показано, что катехоламины и серотонин влияют на рост лактобацилл и бифидобактерий; эффект является штаммоспецифичным и дозозависимым.
- 3) Впервые охарактеризованы гены, контролирующие синтез ГАМК, у штаммов *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f, *B. adolescentis* 150 и *B. angulatum* GT102.
- 4) Впервые показано, что норадреналин влияет на экспрессию генов *feoA*, *feoB*, *trxB*, *mub* у лактобацилл.

### **Практическая значимость**

Работа предлагает новые критерии отбора штаммов для создания эффективных средств терапии нервных расстройств у человека. Критериями отбора подобных штаммов являются способность синтезировать гамма-аминомасляную кислоту и реагировать усилением роста на присутствие катехоламинов наряду с другими пробиотическими свойствами. После прохождения доклинических исследований отобранные и изученные штаммы могут стать основой лекарственного препарата - психобиотика.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

- 1) Способность синтезировать и секретировать в среду ГАМК является преимущественно видоспецифичной и свойственна большинству штаммов лактобацилл видов *L. plantarum* и *L. brevis*, а также бифидобактерий видов *B. adolescentis*, *B. angulatum* и *B. dentium*.
- 2) Катехоламины способны стимулировать рост лактобацилл и бифидобактерий, и эта способность является штаммоспецифичной.
- 3) Пробиотические штаммы лактобацилл и бифидобактерий, синтезирующие ГАМК и усиливающие рост в присутствии катехоламинов и серотонина, являются основой для создания психобиотиков.

### **Апробация результатов работы**

Диссертационная работа апробирована на расширенном заседании кафедры системной экологии экологического факультета РУДН 21 апреля 2016 года.

Материалы диссертации были представлены на международных и Российских конференциях: Международной научной конференции по пробиотиками и пребиотикам, 2015г. (Будапешт, 2015г.); семинаре фонда перспективных исследований по определению приоритетных направлений исследований и разработке новых технологий ускоренной адаптации человека к неблагоприятным климатогеографическим условиям Арктики (Москва, 2016); Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2016).

### **Публикации**

Автором опубликованы 5 печатных работ по теме диссертационной работы; их них 2 в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, а также заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 155 страницах машинописного текста, включает 19 таблиц, 34 рисунка, 1 приложение. Список цитируемых литературных источников включает 276 наименований.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы: в планировании и осуществлении экспериментов, оценке и интерпретации их результатов, составлении литературного обзора. В процессе исследования непосредственно автором осуществлялось выделение ДНК и РНК; конструирование праймеров, проведение ПЦР и электрофореза в агарозном геле; анализ нуклеотидных последовательностей; проведение обратной транскрипции и количественной ПЦР-РВ. Работа по идентификации гамма-аминомасляной кислоты в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии была проведена в Институте биоорганической химии имени Ю.А. Овчиникова и М.М. Шемякина РАН под руководством Ю.С. Скоблова. Работа по изучению влияния пробиотических штаммов на животных выполнена в Институте морфологии человека РАМН под руководством Ю.Е. Козловского. Секвенирование ДНК штаммов проведено совместно с К.М. Климиной на платформе Roche 454 в Институте общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН в лаборатории генетики микроорганизмов. Скрининг штаммов бифидобактерий осуществляли совместно с сотрудником ИОГен РАН Дьячковой М.С. Автор лично проводил

статистическую обработку полученных данных, оформлял результаты для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимал участие в написании статей по результатам экспериментов. В работах, выполненных в соавторстве, использованы материалы исследований с долей личного участия автора 75-95%.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В разделе "Обзор литературы" изложены литературные данные о микробиоте человека; бактериях рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*; гамма-аминомасляной кислоте и её роли в кишечнике; катехоламинах и серотонине и их влиянии на метаболизм бактерий.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Штаммы бактерий, использованные в работе**

В работе был исследован 141 штамм лактобацилл и бифидобактерий, выделенных из различных биотопов организма россиян (кишечник, ротовая полость, влагалище) за исключением 15 штаммов, выделенных из организма жителей Казахстана. Подавляющее большинство штаммов были выделены на кафедре микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии в Тверском государственном медицинском университете. Также использовали несколько типовых штаммов из коллекций ATCC, ГКНМ.

### **Среды и условия роста**

Лактобациллы культивировали в среде MRS (HiMedia, Индия; deMan et al., 1960). Бифидобактерии выращивали в среде MRS с добавлением 0,05% цистеина. Для проверки способности штаммов к синтезу ГАМК добавляли в питательную среду 1% предшественника ГАМК – моновалентной соли глютаминовой кислоты. Опыты с катехоламинами и серотонином проводили в минимальной среде SAPI (Freestone et al., 2000). Перед тем как использовать штамм, его реактивировали по следующей схеме: замороженная культура (-80°C) → чашки со средой MRS (48 часов) → жидкая среда MRS (24 часа) → 1:100 жидкая культура (рабочая культура). Подсчёт колониеобразующих единиц производили методом серийных разведений в 0,82% растворе NaCl с последующим высевом на агаризованную среду MRS.

### **Использованные в работе животные**

Опыты на животных проводили на крысах-самцах линии Спрэг-Доули. Крысы получены из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, Пущино.

### **Молекулярно-генетические методы**

В работе применяли следующие молекулярно-генетические методы: выделение ДНК, конструирование праймеров и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР), электрофорез ДНК в агарозном геле, секвенирование ДНК, выделение тотальной РНК, проведение обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции в

режиме реального времени (ПЦР-РВ). Праймеры конструировали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) и синтезировали в фирме “Синтол” (Россия). Секвенирование ДНК штаммов было проведено в ИОГен на платформе Roche 434.

### **Биохимические методы**

Для разделения аминокислот и идентификации ГАМК в культуральной жидкости исследуемых штаммов использовали тонкослойную хроматографию на стеклянных пластинах с тонким закреплённым слоём силикагеля (TLC plates 10\*20 cm Silicagel 60 F<sub>254</sub> Merck). Для идентификации ГАМК также использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию как более чувствительный метод.

### **Статистические методы**

Статистическая обработка результатов проведена с использованием критерия Стьюдента t для 95% доверительного интервала колебаний средней арифметической.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Отбор штаммов лактобацилл и бифидобактерий, синтезирующих и выделяющих в среду гамма-аминомасляную кислоту**

Для отбора штаммов лактобацилл и бифидобактерий, способных к синтезу ГАМК, была проверена коллекция лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН из 116 штаммов 14 видов лактобацилл и 25 штаммов 3 видов бифидобактерий; штаммы были выделены из микробиоты жителей центрального региона России (Табл. 1). Всего был проверен 141 штамм.

Скрининг проводили методом тонкослойной хроматографии культуральной жидкости штаммов, выращенных в среде MRS с предшественником ГАМК – глутаматом натрия.

**Таблица 1.** Скрининг штаммов лактобацилл и бифидобактерий, способных к синтезу ГАМК.

<b>Вид бактерий</b>	<b>Количество проверенных штаммов</b>	<b>Количество штаммов-продуцентов ГАМК</b>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	24	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	28	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	30	30
<i>Lactobacillus brevis</i>	3	3
<i>Lactobacillus casei</i>	12	0
<i>Lactobacillus helveticus</i>	2	0
<i>Lactobacillus salivarius</i>	4	0
<i>Lactobacillus sakei</i>	1	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	3	0
<i>Lactobacillus mucosa</i>	1	0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	2	0
<i>Lactobacillus buchneri</i>	3	0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2	0
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	21	21
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	3	3
<i>Bifidobacterium dentium</i>	1	1
<b>Всего</b>	<b>141</b>	<b>58</b>



Способность синтезировать и секретировать в среду ГАМК обнаружилась у 58 штаммов; эта способность, по нашим данным, видоспецифична и обнаружена у всех проверенных штаммов видов *L. plantarum* (30 штаммов), *L. brevis* (3 штамма), *B. adolescentis* (21 штамм), *B. angulatum* (3 штамма), *B. dentium* (1). Штаммы видов *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *L. salvei*, *L. mucosa*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. debrueckii*, *L. reuteri*, *L. buchneri* ГАМК не синтезировали. По литературным данным, отдельные штаммы видов *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii* (Dhakul et al., 2012) синтезируют ГАМК. Вероятно, подобные штаммы являются результатом горизонтального переноса генов, контролирующих синтез ГАМК.

### **Определение количества ГАМК, синтезируемой лактобациллами и бифидобактериями**

Количество синтезируемой ГАМК в культуральной жидкости определяли методом двумерного сканирования хроматографических пластинок. Результаты представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Способность штаммов лактобацилл и бифидобактерий синтезировать ГАМК.

Штаммы	Продукция ГАМК, мкг/мл	Штаммы	Продукция ГАМК, мкг/мл	Штаммы	Продукция ГАМК, мкг/мл
<i>Lactobacillus plantarum</i>		42/2	120	48-2	2052
119 sk	99	38/1	47	108	916
106 zv	36	19/1A	32	174	234
8-PA-3	105	14/4	27	150	5611
90 sk	210	7/1	68	110	2130
29sk	257	3/1	66	152	5016
46sk	62	57/1	149	277	2887
75sk	19	56/1	104	104	782
32sk	184	52/1	68	191	257
K9L	78	50/2	13	282	1489
CS396	74	<i>Lactobacillus brevis</i>		Km4	2765
36st	30	47st	100	Km5-1	4942
29st	6	52st	50	S14	2333
46k	110	15f	675	S11	854
191g	133	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		Tv29	441
50st 3	87	56	19	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	
K13	18	57	3023	102	3469
43/5	176	76	850	334-1	2616
43/4	185	44	2302	212	3214
43/3	92	44-2	2966	<i>Bifidobacterium dentium</i>	
43/2	101	48	3090	9	2465

Примечание: лактобациллы выращивали 3 суток, бифидобактерии – 2 суток.

Способность к синтезу ГАМК варьировала в пределах одного вида и была относительно низкой для лактобацилл; у штаммов вида *L. plantarum* она не превышала 257 мкг/мл, у штаммов вида *L. brevis* количество синтезируемой ГАМК было максимальным у штамма *L. brevis* 15f, способного синтезировать до 675 мкг/мл. Продукция ГАМК штаммами

*B. adolescentis* достигала значительно больших величин (до 5611 мкг/мл), но также варьировала в широких пределах. В целом, штаммы рода *Bifidobacterium* были более эффективными продуцентами ГАМК, чем лактобациллы.

### **Наличие генов *gadB* у штаммов лактобацилл и бифидобактерий**

У штаммов тех видов, что были представлены в нашей коллекции значительным числом штаммов, методом полимеразой цепной реакции было определено присутствие гена *gadB*, кодирующего фермент глутаматдекарбоксилазу и ответственного за синтез ГАМК. Ни у одного из штаммов *L. rhamnosus* и *L. casei* из GenBank не было генов *gadB*; для этих видов мы не смогли сконструировать праймеры и не проверяли штаммы данных видов.

**Таблица 3.** Наличие гена *gadB* у штаммов различных видов лактобацилл и бифидобактерий.

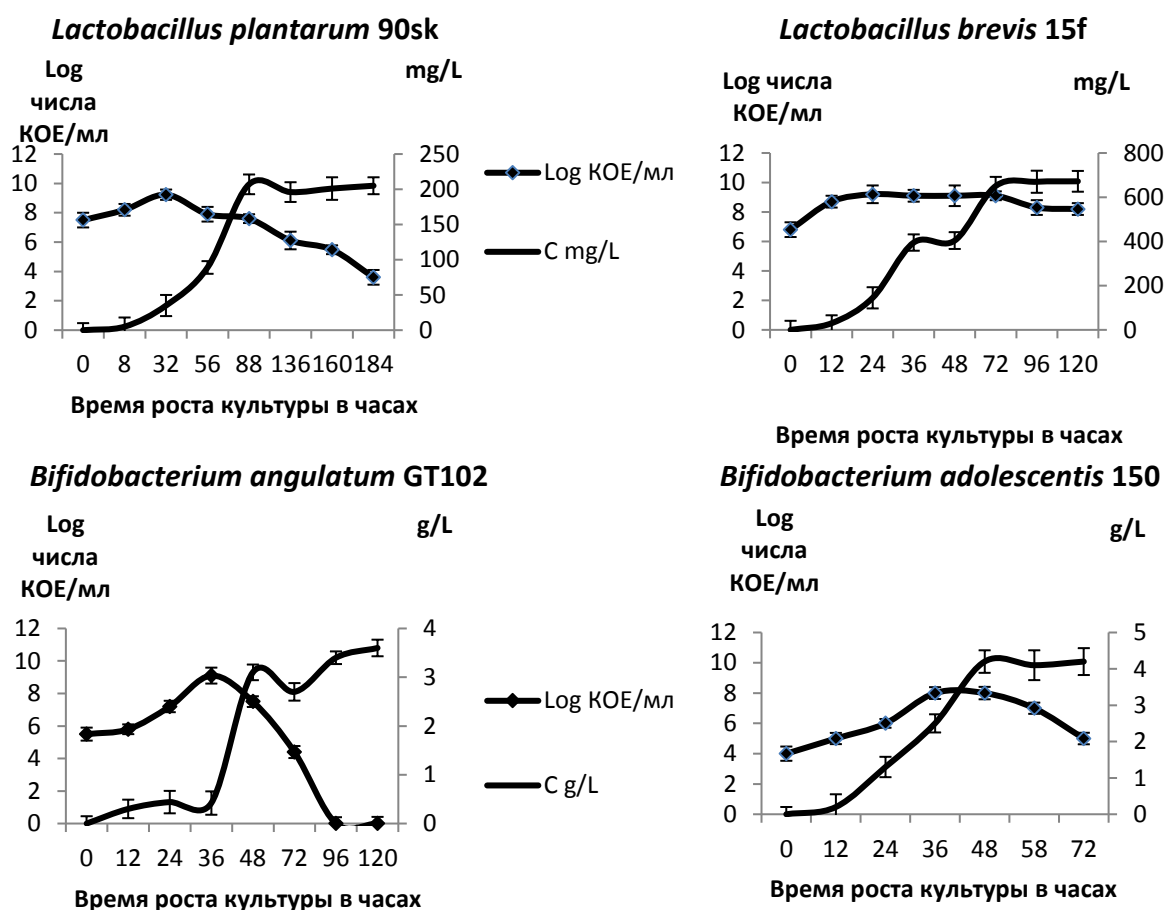
Вид бактерий	Количество проверенных штаммов	Наличие гена <i>gadB</i> по данным ПЦР
<i>L. fermentum</i>	24	9
<i>L. plantarum</i>	31	31
<i>L. brevis</i>	4	4
<i>B. adolescentis</i>	21	21
<i>B. angulatum</i>	3	2
<i>B. dentium</i>	1	1

В результате проведённых ПЦР, у всех ГАМК-продуцирующих штаммов, кроме *B. angulatum* 212, удалось амплифицировать ген *gadB* (Табл. 3). Возможно, это результат мутации в месте отжига праймера у данного штамма. Стоит отметить, что наличие гена не всегда совпадало со способностью синтезировать ГАМК, так как некоторые штаммы *L. fermentum* содержали ген *gadB*, но не были способны к синтезу ГАМК. Это может быть следствием мутации в гене *gadB* или мутации/делеции гена *gadC*, кодирующем глутамат/ГАМК антипортер, ответственный за экспорт ГАМК из клетки.

### **Характеристика синтеза ГАМК у 4-х штаммов бактерий, отобранных в качестве потенциальных пробиотиков**

Для подробных исследований были отобраны два штамма лактобацилл и два штамма бифидобактерий, которые предположительно могли быть использованы в будущем в качестве пробиотиков. Это – штаммы *Lactobacillus plantarum* 90sk, *Lactobacillus brevis* 15f, *Bifidobacterium angulatum* GT102 и *Bifidobacterium adolescentis* 150. Отобранные штаммы синтезировали наибольшее количество ГАМК для своего вида и характеризовались пробиотическими свойствами (высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным штаммам, антиоксидантными свойствами), установленными ранее.

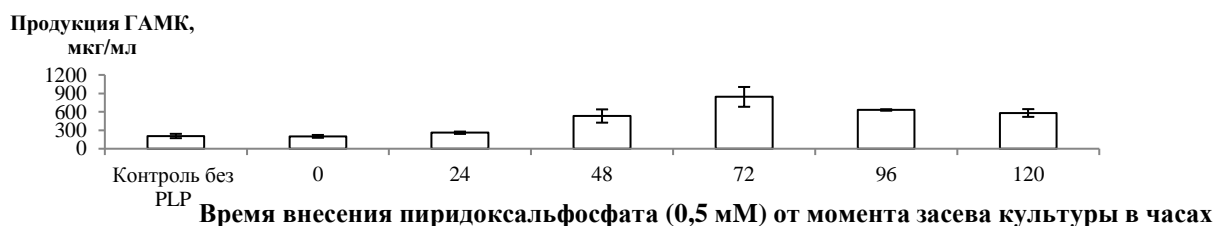
Были изучены динамика синтеза ГАМК в среде MRS и влияние добавления кофактора фермента глутаматдекарбоксилазы, пиридокальфосфата, для четырёх отобранных штаммов.



**Рисунок 1.** Продукция ГАМК штаммами *Lactobacillus plantarum* 90sk, *Lactobacillus brevis* 15f, *Bifidobacterium angulatum* GT102 и *Bifidobacterium adolescentis* 150.

Все исследованные штаммы начинали синтезировать ГАМК через 8 часов роста; количество ГАМК достигало максимум через 48 часов (бифидобактерии) и 90 часов (лактобациллы) (рис.1).

Пиридоксаль-5-фосфат (витамин B6, PLP) является кофактором всех исследованных глутаматдекарбоксилаз. Представляло интерес установить, насколько добавление PLP повышает продукцию ГАМК у четырёх отобранных штаммов лактобацилл и бифидобактерий.

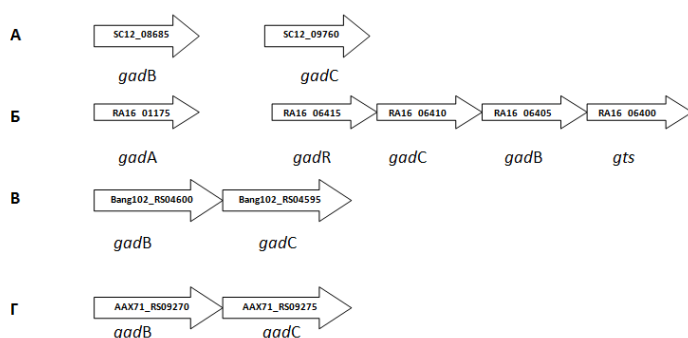


**Рисунок 2.** Влияние добавления кофактора пиридоксаль-5-фосфата (PLP) на синтез ГАМК штаммом *L. plantarum* 90sk. Все культуры росли 144 часа.

Как видно из рисунка 2, добавление PLP при засеве культуры *L. plantarum* 90sk, т.е. на первой стадии роста (лаг-фазе), не приводило к увеличению количества ГАМК (201 мкг/мл) в культуральной жидкости по сравнению с контролем без добавления PLP (207 мкг/мл). Добавление PLP на ранней стационарной фазе (24 ч.) стимулировало активность фермента незначительно (260 мкг/мл). Максимальное увеличение (843 мкг/мл) ГАМК было достигнуто при добавлении PLP на поздней стационарной фазе (72 ч.). Вероятно, при использовании данного штамма в качестве психобиотиков целесообразно включать в препарат пиридоксин. Что касается двух штаммов *B. angulatum* GT102, *B. adolescentis* 150, добавление PLP не оказало заметного влияния на синтез ГАМК. Вероятно, это связано с тем, что эти штаммы способны синтезировать PLP. Анализ нуклеотидной последовательности ДНК штаммов показал наличие генов *pdxST*, контролирующих *de novo* синтез витамина В6. У штамма *L. brevis* 15f добавление PLP также не влияло на синтез ГАМК, хотя генов, контролирующих синтез витамина В6, штамм не имел. Можно предположить, что у штамма существует прочная связь апофермента с кофактором и глутаматдекарбоксилазе хватает минимальных количеств кофактора, присутствующих в среде роста.

### Характеристика генов, обуславливающих синтез ГАМК

Целью данного раздела являлась изучение структуры *gad*-локусов у 4-х исследуемых штаммов. *gad*-гены видов *L. plantarum*, *B. adoslescentis* и *B. angulatum* практически неохарактеризованы в литературе. *gad*-оперон у вида *L. brevis* охарактеризован (Li et al., 2013), но представляло интерес сравнить его структуру у описанных штаммов и у отобранного нами штамма *L. brevis* 15f. Для этого ДНК штаммов, отобранных как потенциальные пробиотики, была секвенирована. Результаты поиска генов, определяющих синтез ГАМК у данных штаммов, предоставлены на рисунке 3 и в таблице 4.



**Рисунок 3.** Структурная организация *gad*-оперонов штаммов *L. plantarum* 90sk (А), *L. brevis* 15f (Б), *B. angulatum* GT102 (В) и *B. adolescentis* 150 (Г); *gadB*, ген глутаматдекарбоксилазы В; *gadA*, ген глутаматдекарбоксилазы А; *gadC*, ген антипортера глутамат/ГАМК; *gadR*, транскрипционный регулятор; *gts*, ген глутамил тРНК синтетазы.

Как и у других штаммов *L. brevis* (De Biase and Pennacchiotti, 2012), у *L. brevis* 15f были идентифицированы ген глутаматдекарбоксилазы А *gadA*, ген глутаматдекарбоксилазы В *gadB*, ген антипортера глутамат/ГАМК *gadC*, транскрипционный регулятор *gadR* и ген глутамил тРНК синтетазы *gts*.

Для *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* 150 можно предположить наличие оперона из расположенных рядом генов глутаматдекарбоксилазы и антипортера. У *L. plantarum* 90sk рядом с *gadB* геном нет гена, соответствующего антипортеру; ген, чей белок имеет гомологию с антипортером *L. brevis* (25%) и аннотируется как аминокислотный транспортер расположен в другом месте хромосомы и можно предположить, что именно он - антипортер, хотя окончательных доказательств пока нет (рис. 3). У всех 4-х штаммов мы нашли ген, кодирующий фермент глутаматдекарбоксилазу *gadB* и ген, кодирующий антипортер *gadC*, что говорит о важности этих генов для синтеза и транспорта ГАМК.

Мы хотели выяснить отличаются ли отобранные нами штаммы лактобацилл и бифидобактерий по строению генов/белков *gadB/C* от описанных в других работах. Для этого мы сравнили аминокислотный состав этих белков у наших штаммов и штаммов из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Уникальные замены могут служить маркерами для идентификации и типирования штаммов лактобацилл и бифидобактерий.

**Таблица 4.** Уникальные замены в аминокислотных последовательностях белков, участвующих в синтезе и транспорте ГАМК, у *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f, *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* 150.

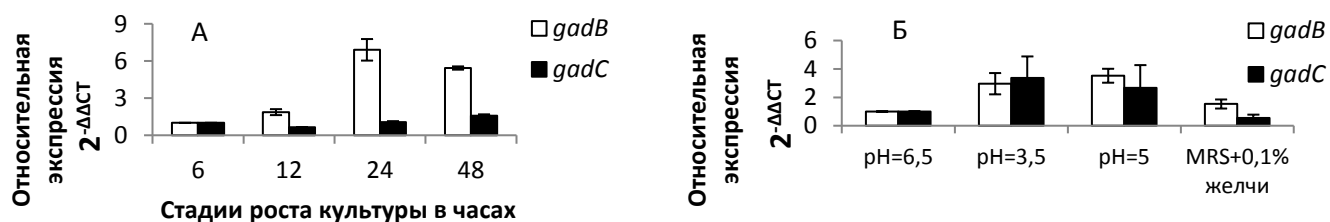
Ген	белок	Количество выровненных последовательностей	Уникальные аминокислотные замены в белке	Величина белка
<i>L. plantarum</i> 90sk				
<i>gad</i>	Глутаматдекарбоксилаза	8	D <sub>341</sub> /G	470 ак
<i>gadC</i>	Предполагаемый Глутамат/ГАМК антипортер	6	E <sub>2</sub> /A	479 ак
<i>L. brevis</i> 15f				
<i>gadC</i>	Глутамат/ГАМК антипортер	4	E <sub>7</sub> /G I <sub>141</sub> /V V <sub>247</sub> /I N <sub>266</sub> /S G <sub>289</sub> /S V <sub>291</sub> /I A <sub>369</sub> /S	505 ак
<i>gadA</i>	Глутаматдекарбоксилаза А	6	D <sub>38</sub> /N T <sub>234</sub> /M E <sub>437</sub> /K	480 ак
<i>gadB</i>	Глутаматдекарбоксилаза В	6	A <sub>224</sub> /V	469 ак

Ген	белок	Количество выровненных последовательностей	Уникальные аминокислотные замены в белке	Величина белка
<b><i>B. angulatum</i> GT102</b>				
<i>gadB</i>	Глутаматдекарбоксилаза	3	T <sub>4</sub> / M P <sub>127</sub> / L I <sub>264</sub> / M	478 ак
<i>gadC</i>	Предполагаемый Глутамат/ГАМК антипортер	3	V <sub>31</sub> / I R <sub>171</sub> / H M <sub>273</sub> / V R <sub>314</sub> / K	469 ак
<b><i>B. adolescentis</i> 150</b>				
<i>gadB</i>	Глутаматдекарбоксилаза	6	Отсутствуют	451 ак
<i>gadC</i>	Предполагаемый Глутамат/ГАМК антипортер	6	Отсутствуют	470 ак

Сравнительный анализ последовательностей аминокислот белков, участвующих в синтезе ГАМК, у *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f и *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* 150 с последовательностями аминокислот у других штаммов тех же видов из GenBank показал, что исследованные белки штаммов *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f и *B. angulatum* GT102 содержат от 2-х до 11 уникальных замен. Это свидетельствует об отличии штаммов Российской популяции от имеющихся в GenBank. Что касается штамма *B. adolescentis* 150, мы не нашли уникальных замен в исследованных белках. Результаты представлены в таблице 4.

#### Изучение экспрессии генов глутаматдекарбоксилазы и глутамат/ГАМК антипортера у штамма *L. plantarum* 90sk

Представляло интерес изучить условия, влияющие на экспрессию *gad*-генов кодирующих глутаматдекарбоксилазу (ген *gadB*) и глутамат/ГАМК антипортер (ген *gadC*). Для этих опытов выбрали штамм *L. plantarum* 90sk. Была исследована экспрессия генов *gadB* и *gadC* на различных стадиях роста, при различных pH среды и при добавлении желчи.



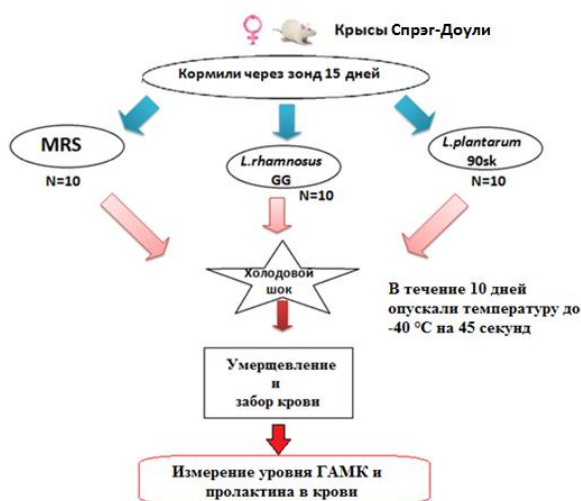
**Рисунок 4.** А. Относительная экспрессия генов *gadB* и *gadC* на различных стадиях роста *L. plantarum* 90sk (в качестве контрольного использован ген *recA*). Б. Влияние различных условий на экспрессию генов *gadB* и *gadC* *L. plantarum* 90sk в стационарной фазе (24 часа) относительно гена *recA*. Выбранные условия и индукции экспрессии (pH 3,5; 5; 0,1% желчи) не влияли на жизнеспособность штамма. На графике изображена относительная экспрессия, пересчитанная методом ΔΔСТ.

Транскрипционная активность гена *gadB* начинала увеличиваться (в 2 раза) в экспоненциальной фазе роста. Максимальное увеличение экспрессии гена *gadB* относительно начальной экспоненциальной фазы (в 6-8 раз) было достигнуто в начале стационарной фазы. Ген *gadB* продолжал активно транскрибироваться и дальше в поздней стационарной фазе роста; в этих условиях наблюдалось относительное увеличение экспрессии – в 5-6 раз. Экспрессия гена *gadC*, кодирующего антипортер, была максимальной в стационарной фазе роста (двукратное увеличение). Увеличения экспрессии этого гена в экспоненциальной фазе не обнаружено.

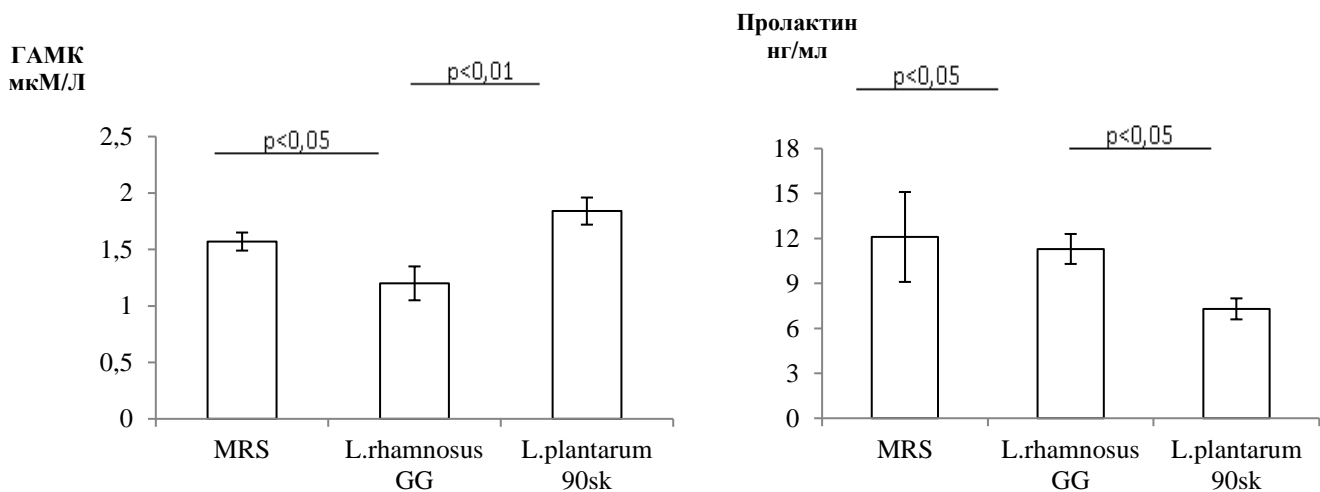
Понижение pH среды до 3,5 и 5 в стационарной фазе роста культуры стимулировало экспрессию гена *gadB* относительно контроля в 3 и 3,5 раза соответственно; экспрессия гена *gadC* увеличивалась в 3,5 и 3 раза. Влияния 0,1% желчи на экспрессию генов *gadB* и *gadC* не отмечено (рис. 4Б).

#### **Опыты по определению влияния штамма *L.plantarum* 90sk на крыс в условиях холодового шока.**

Для проверки предполагаемого эффекта ГАМК-продуцирующего штамма *L. plantarum* 90sk на животных были проведены опыты на крысах линии Спрэг-Доули, подвергнутых холодовому шоку. Штамм *L. plantarum* 90sk был выбран потому, что помимо синтеза ГАМК, он обладал оптимальными пробиотическими свойствами (антиоксидантными свойствами, антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным штаммам, устойчивостью к низким pH). В качестве штамма сравнения был выбран пробиотический штамм *L. rhamnosus* GG, неспособный к синтезу ГАМК (рис. 5).



**Рисунок 5.** Схема опыта по определению влияния штамма *L. plantarum* 90sk на крыс в условиях холодового шока.



**Рисунок 6.** Количество ГАМК и пролактина в крови крыс Спрэг-Дуули по окончании опыта.

Уровень ГАМК в крови крыс, получавших ГАМК-продуцирующий штамм, был достоверно выше по сравнению с двумя контрольными группами (MRS и *L. rhamnosus* GG). Количество гормона пролактина в крови крыс, получавших штамм *L. plantarum* 90sk, было достоверно ниже, чем у крыс получавших стерильную среду MRS и штамм *L. rhamnosus* GG. Увеличение содержания ГАМК в крови крыс опытной группы свидетельствует о том, что штамм *L. plantarum* 90sk синтезировал в кишечнике ГАМК, которая затем попадала в кровяное русло. Снижение уровня пролактина у крыс опытной группы говорит о том, что данный штамм, введённый в кишечник животных, влиял на содержание пролактина в крови и, возможно, увеличивал адаптацию крыс к холодовому стрессу (рис. 6).

### **Оптимизация условий опытов по изучению влияния нейротрансмиттеров на рост лактобацилл**

Для исследования влияния на рост лактобацилл и бифидобактерий были выбраны 3 нейротрансмиттера, относящихся к семейству катехоламинов (норадреналин, адреналин и дофамин), продукция которых организмом человека значительно увеличивается в стрессовых условиях. Действие серотонина на рост бактерий мы рассматривали как контроль, так как серотонин присутствует постоянно в кишечнике и не связан с реакцией организма на стресс.

Опыты по оптимизации условий проведены со штаммом *L.plantarum* 90sk. Выращивание штамма *L. plantarum* 90sk в среде MRS с норадреналином и дофамином не приводило ни к стимуляции, ни к ингибированию роста. Поэтому мы выбрали другую питательную среду – SAPI – на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, которую ранее использовали в аналогичных опытах с другими бактериями.

Были установлены оптимальные концентрации норадреналина (100 мкM), исходная концентрация бактериальных клеток, необходимая для проявления эффекта ( $10^2$  КОЕ/мл) и



длительность выращивания культуры (48-72 часа). В данных условиях бактериальная культура либо не росла совсем, либо росла плохо. Добавление катехоламинов и серотонина позволяло культуре расти или усиливало рост (культура формировала большее число КОЕ/мл за тот же промежуток времени).

**Изучение влияния норадrenalина, адреналина, дофамина и серотонина на рост различных штаммов лактобацилл и бифидобактерий**

Целью изучения влияния нейротрансмиттеров на рост различных штаммов лактобацилл и бифидобактерий являлось установление реакции штаммов на присутствие этих веществ (стимуляция/ингибирование) и определение отличий между штаммами одной видовой группы.

**Таблица 5.** Влияние катехоламинов и серотонина на рост штаммов 10 видов бактерий.

Вид бактерий	Штамм	Норадrenalин	Адреналин	Дофамин	Серотонин
<i>Lactobacillus plantarum</i>	90sk	+++	++	++	Н/В
	k-13	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	29st	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	36st	Н/В	+	Н/В	+
	46k	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	29sk	++	++	++	+
	43/2	+	+	+	Н/В
	3/1	++	++	+	+
	56/1	+	+	+	Н/В
	42/2	++++	++	+	Н/В
	57/1	++	+	+	Н/В
	50/2	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	14/4	++	++	+	+
	46/9	+++	+	+	Н/В
	7/1	+++	++	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	19A	+++	+	+	+
	52/1	+	Н/В	+	Н/В
	38/1	++	++	++	Н/В
	GG	++	++	++	++
	24	+	+	+	Н/В
	2gn	Н/В	++	Н/В	Н/В
	22gn	+	+	++	Н/В
	51gn	+++	+++	+++	++
	316	+++	++	++	+
	471	++++	Н/В	+++	Н/В
	308	+++	Н/В	+	+++
	50zv	+	+	+	+
	26sk	+	+	++	Н/В
	116	++++	++	+	+++
	251	+	+	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	12sk	++	++	++	Н/В
	103sk	++	++	++	Н/В
	279	++	++	++	Н/В
	NB-22	+	+++	++	Н/В
	347	++	Н/В	+++	Н/В
	439	+	+	Н/В	Н/В
	253	+	++	Н/В	+
	291	+++	Н/В	+++	+
	369	+++	++++	Н/В	+
	U-21	++	++	++	Н/В
	102sk	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	108sk	+++	+	Н/В	+
	311	Н/В	Н/В	+	Н/В
339	++++	+++	Н/В	+	
<i>L. brevis</i>	15st	Н/В	+	++	+
	47st	+	Н/В	+	Н/В
<i>L. buchneri</i>	364	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	381-1	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В

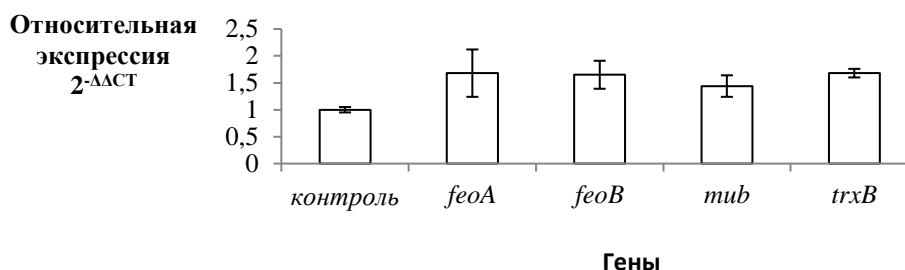
Вид бактерий	Штамм	Норадреналин	Адреналин	Дофамин	Серотонин
<i>L. casei</i>	42st	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	48st	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	131	++	++	++	+++
<i>L. helveticus</i>	NNIE	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	100H	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	315	+	+	+	+
<i>L. salivarius</i>	44st	+++	++	++++	+
	64sk	+++	Н/В	++	0
	321	++	Н/В	++	++
<i>B. adolescentis</i>	Km-4	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
	48	++++	++++	++++	++++
	150	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
<i>B. angulatum</i>	GT102	+	+	+	+

Примечание. + - увеличение на один порядок; ++ - увеличение на два порядка; +++ - увеличение на три порядка; ++++ - увеличение на четыре порядка. Н/В - нет влияния.

Изучив влияние катехоламинов и серотонина на рост штаммов лактобацилл, можно сделать главный вывод – катехоламины и серотонин влияют на рост лактобацилл и бифидобактерий. Из 61 проверенного штамма 48 усиливали рост в присутствии хотя бы одного из нейротрансмиттеров. Влияние штаммоспецифично, т.е. разные штаммы в пределах одной видовой группы по-разному реагировали на присутствие катехоламинов (табл. 5).

#### Изучение влияния норадреналина на транскрипционную активность генов *L. plantarum* 90sk в среде SAPI методом ПЦР в реальном времени

Нами было изучено влияние норадреналина на транскрипционную активность ряда генов у штамма *L. plantarum* 90sk. Были выбраны гены, вовлечённые в процессы, потенциально стимулируемые норадреналином. Это гены транспорта железа (*feoA*, *feoB*), гены антиоксидантной активности (*trxB*) и гены адгезии (*mub*, *ccpA*). Гены *feoA* и *feoB*, кодируют белки, транспортирующие ионы железа внутрь клетки. Ген *trxB* кодирует синтез тиоредоксина. Ген *mub* кодирует белок – фактор адгезии к слизистой оболочке. *CcpA* является белком, ингибирующим транскрипцию катаболитных генов. Его активность считается одним из маркеров образования биопленок.



**Рисунок 7.** Экспрессия генов штамма *L. plantarum* 90sk в присутствии норадреналина относительно гена *recA*. На графике изображена относительная экспрессия, пересчитанная методом ΔΔСТ.

Норадреналин достоверно стимулировал транскрипционную активность генов, участвующих в транспорте железа (*feoA*, *feoB*), антиоксидантной активности (*trxB*) и адгезии (*mub*) у штамма *L. plantarum* 90sk (рис. 7). Влияния норадреналина на транскрипционную активность гена *ccpA* не было. Таким образом, норадреналин не просто увеличивал рост штаммов лактобацилл и бифидобактерий, а влиял на экспрессию генов, и вероятно, важные физиологические процессы клеток – метаболизм железа, антиоксидантные свойства, адгезию.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе были исследованы штаммы лактобацилл и бифидобактерий (141 в одной части работы и 61 – в другой). Показано, что часть этих штаммов способна синтезировать и секретировать в среду ГАМК. Это свойство оказалось видоспецифичным и было присуще всем нашим штаммам видов *L. plantarum*, *L. brevis*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. dentium*. Более 80% проверенных штаммов реагировали усилением роста (в  $10\text{--}10^4$  раз по числу КОЕ/мл) на присутствие в среде катехоламинов и серотонина. Данная особенность была штаммоспецифичной. Результаты опытов по введению штамма-продуцента ГАМК животным, находящимся в условиях стресса, показали, что в крови животных увеличивалось количество ГАМК и уменьшалось – гормона пролактина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГАМК, катехоламины и серотонин участвуют в коммуникации бактерий-симбионтов (лактобацилл и бифидобактерий) с организмом человека. Способность синтезировать ГАМК, активация роста микроорганизмов и транскрипции ряда генов под действием катехоламинов и серотонина являются важными свойствами бактерий и, по-видимому, могут быть использованы при селекции пробиотических штаммов. Получены данные, указывающие на адаптивную роль исследованных штаммов лактобацилл и бифидобактерий, продуцирующих ГАМК, для организма хозяина.

## ВЫВОДЫ

- 1) Из вагинального содержимого микробиоты человека выделены и идентифицированы штаммы *L. salivarius*, *L. crispatus*; из фекалий – штаммы *L. casei*, *L. buchneri*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*; из слюны – штаммы *L. casei*, *L. plantarum*. Во всех трех изученных биотопах доминировали виды *L. rhamnosus* и *L. fermentum*.
- 2) Большинству исследованных штаммов лактобацилл и бифидобактерий (58 из 141 штамма 17 видов) присуща видоспецифическая особенность (*L. plantarum*, *L. brevis*, *B. angulatum*, *B. adolescentis* и *B. dentium*) синтезировать и секретировать в среду ГАМК (до 5,6 г/л). Добавление кофактора PLP (на поздней стационарной фазе роста) увеличивало продукцию ГАМК в 4 раза у штамма *L. plantarum* 90sk и не влияло на ее синтез у штаммов *L. brevis* 15f, *B. angulatum* GT102 и *B. adolescentis* 150.
- 3) У штаммов *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f, *B. angulatum* GT102, *B. adolescentis* 150 идентифицированы гены *gadB* (глутаматдекарбоксилазы) и *gadC* (глутамат/ГАМК антипортера). В белках GadB и GadC штаммов *L. plantarum* 90sk, *L. brevis* 15f, *B. angulatum* GT102 найдены уникальные аминокислотные замены, свидетельствующие об отличии белков/генов от идентифицированных ранее гомологов. У штамма *L. plantarum* 90sk гены *gadB* и *gadC* максимально экспрессировались в стационарной фазе роста. Понижение pH среды до 3,5 и 5,0 индуцировало транскрипционную активность данных генов.
- 4) Катехоламины (дофамин, норадреналин, адреналин) и серотонин в солевой среде с сывороткой крови на 1-4 порядка усиливают рост 30 из 61 проверенных штаммов лактобацилл и бифидобактерий. Штамм *L. plantarum* 90sk реагирует на присутствие норадреналина активацией транскрипции ряда генов (*feoA*, *feoB*, *trxB*, *mub*).
- 5) При введении этого штамма крысам линии Спрэг-Доули в условиях холодового шока повышается уровень ГАМК и понижается уровень гормона пролактина в крови.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Отбор бактерий-симбионтов рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* по их способности синтезировать гамма-аминомасляную кислоту – один из подходов в получении психобиотиков / **Р.А. Юнес**, Е.У. Полуэктова, М.С. Дьячкова, Ю.Е. Козловский, В.С. Орлова, В.Н. Даниленко // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2016. - № 4 – С. 51-59.
- 2) Патент 257625 РФ. Шаммы *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus brevis*, синтезирующие гамма-аминомасляную кислоту / В.Н. Даниленко, **Р.А. Юнес**, Е.У. Полуэктова // Бюл. - 2016 - №5 – С. 21.
- 3) Draft genome sequences of *Lactobacillus plantarum* strain 90sk and *Lactobacillus brevis* strain 15f: focusing on neurotransmitter genes / **R.A. Yunes**, К.М. Klimina, К.В. Emelyanov, N.Z. Zakharevich // Genome Announc. – 2015. – Vol. 3. - № 2. – e00261-15.

### **Публикации в сборниках конференций**

- 1) Разработка препаратов психобиотиков, направленных на снятие депрессивных состояний, вызываемых длительными стрессами / Е.У. Полуэктова, **Р.А. Юнес**, М.С. Дьячкова, Ю.Е. Козловский, В.Н. Даниленко // Тезисы российско-китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения) 14-16 июня 2016, Санкт-Петербург. Проблемы медицинской микологии. 2016. – Т. 18. - №2. - С. 28.
- 2) Gamma-Aminobutyric Acid Producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains Isolated From the Human Body – candidates for Future Psychobiotics / **R.A. Yunes**, M.S. Dyachkova, Y.E. Kozlovsky, E.U. Poluektova, N.F. Chertovich, O.V. Averina, К.М. Klimina, V.Z. Nezametdinova, V.N. Danilenko, Proceedings of International Scientific Conference Probiotics And Prebiotics in Budapest. 22-26 June 2015. - С. 104.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

**ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН**

*Лаборатория генетики микроорганизмов*

д.б.н. Даниленко Валерий Николаевич

д.б.н. Полуэктова Елена Ульриховна

к.б.н. Аверина Ольга Викторовна

к.б.н. Незаметдинова Венера Закировна

к.б.н. Климина Ксения Михайловна

Дьячкова Марина Владимировна

Епифанова Майя Валерьевна

**ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»**

*Кафедра системной экологии*

д.б.н. Орлова Валентина Сергеевна

**ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и**

**Ю.А. Овчинникова РАН**

*Лаборатория изотопных методов анализа*

к.х.н. Скоблов Юрий Самойлович

**ФГБУН «НИИ морфологии человека» РАМН**

*Лаборатория молекулярной микрoэкологии*

к.б.н. Козловский Юрий Евгеньевич

**Роман Юнес (Россия)**

### **Адаптивное значение для человека бактерий рода *Lactobacillus* и рода *Bifidobacterium***

Совокупность населяющих тело человека микроорганизмов (преимущественно бактерий) - микробиота - играет чрезвычайно важную роль в адаптации организма к стрессу. Отдельные штаммы пробиотических бактерий (психобиотики) способны положительно влиять на эмоциональное поведение, восприятие боли, стресса у лабораторных животных и даже людей. В настоящее время актуальной задачей является разработка подходов к поиску психобиотиков. Изучение веществ, осуществляющих взаимодействие бактерий кишечной микробиоты и организма человека, позволит понять механизм взаимодействия и разработать принципы создания таргетных пробиотических препаратов. В данной работе была исследована способность 141 штамма 17 видов лактобацилл и бифидобактерий синтезировать гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) и реагировать на присутствие катехоламинов. Способность синтезировать ГАМК оказалась видоспецифичной и была присуща всем исследованным штаммам видов *L. plantarum*, *L. brevis*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. dentium*. Более 80% проверенных штаммов реагировали усилением роста на присутствие в среде катехоламинов и серотонина; данная особенность была штаммоспецифичной. Введение штамма-продуцента ГАМК животным, находящимся в условиях стресса, приводило к увеличению в сыворотке крови количества ГАМК и уменьшению гормона пролактина. Подробно изучены четыре штамма – наиболее перспективные потенциальные психобиотики.

**Roman Yunes (Russia)**

### **The adaptive role of *Lactobacillus* and *Bifidoabcterium* strains for human health**

Bacteria inhabiting the human body (microbiota) play a major role in its adaptation to stress. Certain probiotic strains (psychobiotics) exert a positive influence on the emotional state, pain perception and stress in animals and even people. Therefore it is currently important to develop new approaches for selecting psychobiotics. Studying the molecules involved in the interaction between the gut microbiota and the host organism will bring an understanding of this mechanism and allow the development of targeted probiotics. In this work, we studied the ability of 141 *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of 17 species to produce gamma aminobutyric acid (GABA) and to respond to catecholamines and serotonin. The results show that the ability to produce GABA was species-specific and was found in *L. plantarum*, *L. brevis*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. dentium*. More than 80% of the strains were able to increase their growth in response to the addition of catecholamines and serotonin to the growth medium; this feature was strain-specific. Ingestion of GABA-producing strain by stressed rats lead to an increase of GABA and decrease of prolactin in their blood serum. Four strains were extensively studied as promising potential psychobiotics.