

УДК 579.65+699.887:52
№ держ. реєстрації 0118U003750

Національна академія наук України
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАН УКРАЇНИ
(ІМБіГ)
03143, м.Київ-143, вул. Заболотного 150,
тел/факс (044) 526-11-69

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту молекулярної біології
і генетики
академік НАН України

_____ Г.В.Єльська

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
за договором від 12.02.2018 №47/18

«ДОВЕДЕННЯ КОНЦЕПЦІЇ СТВОРЕННЯ ПОСТБІОТИКІВ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ
РОЗЛАДІВ ЗДОРОВ'Я КОСМОНАВТІВ»
(проміжний)

Керівник НДР
Завідувач лабораторії мікробної екології,
старший науковий співробітник,
кандидат біологічних наук

Н. О. Козировська

2018

Рукопис закінчено 16 листопада 2018 року.

Результати цієї роботи розглянуто Вченою радою ІМБіГ
(протокол № 14 від 20 листопада 2018 року)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: «Доведення концепції створення постбіотиків для профілактики розладів здоров'я космонавтів», 25 с., 7 рис., 37 джерел.

Об'єкт дослідження — мультимікробна культура комбучі (МКК).

Мета роботи — оцінити зміни у композиції метавезикулому МКК після польоту на міжнародну космічну станцію (МКС) та експонування в імітованих марсіанських умовах.

Методи дослідження — мікробіологічні, генетичні, мікроскопічні, фізичні.

В імітованих марсіанських умовах після експерименту ESA BIOMEX (Biology and Mars Experiment), який проводився на об'єкті EXPOSE-R2 зовні модуля Звезда на МКС метавезикулом змінюється: везикули зразків МКК, що повернулися після перебування на МКС і перебували на верхньому, відкритому до дії УФ-С носієві, відрізнялися менш складною структурою везикулому, розмірами, кількістю та складом мембрани від наземного контролю. Після серії пасажів культивування, відроджені угруповання частково відновили склад ПМВ та пов'язані з ним активності.

КОМБУЧА, ПОСТБІОТИК, МЕТАВЕЗИКУЛОМ, ВІРУСО-ПОДІБНІ ЧАСТИНКИ

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР
зав. лабораторією
канд. біол. наук, с.н.с.

Н. О. Козировська
(реферат, вступ, висновки)

Відповідальний виконавець
ст. наук. співроб.
канд. біол. наук

І. Є. Заєць
(розд 2)

Науковий співробітник
канд. біол. наук

О. В. Подоліч
(розд 1)

Науковий співробітник,
канд. техн. наук

О. Є. Кухаренко
(розд. 3)

Молодший науковий
співробітник,

І. В. Орловська
(розд. 3)

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів	5
Вступ	6
1. Огляд літератури	7
1.1. Стабільні симбіотичні мікробні угруповання в якості перспективних екосистем для космічних досліджень	7
1.2. Практичне використання мікробної культури комбучі (МКК) у космічній галузі	8
1.2.1. Цінний синбіотик	8
1.2.2. Переваги МКК в якості пробіотика	9
1.2.3. Постбіотик	10
1.2.3.1. Позаклітинні мембранні везикули як компонент секретому МКК	10
1.2.3.2. Переваги МКК як постбіотика	11
1.2.3.3. Оцінка ризиків МКК : визначення вірусоподібних частинок	12
2. Матеріали і методи	13
2.1. Мікроорганізми	13
2.2. Культуральні середовища та умови культивування	13
2.3. Виділення та візуалізація позаклітинних мембранних везикул (ПМВ) та бактеріофагів з космічних зразків	13
2.4. Дослідження ПМВ з космічних зразків	14
2.4.1. ІЧ-спектроскопія порушеного повного відбиття з перетворенням Фур'є (ATR-FTIR)	14
2.4.2. Визначення генотоксичності космічних везикул	14
2.4.3. Визначення зміни електрофоретичної рухливості (EMSA)	15
2.4.4. Визначення активності дегідрогеназ (ДГ, ЕС 1.1)	15
2.4.5. Статистична обробка даних	15
3. Результати	16
3.1. Метавезикулом МКК	16
3.2. Зміни у клітинних мембранах везикул експонованих зразків	17
3.3. Вплив позаклітинних везикул на ДНК бактерій	18
3.3.1. Взаємодія з плазмідною ДНК <i>E.coli</i>	18
3.3.2. Взаємодія з геномною ДНК <i>E.coli</i>	19
3.4. Дегідрогеназна активність позаклітинних везикул	19
3.5. Активація профагів МКК	20
Висновки	21
Публікації за темою проекту	22
Перелік джерел посилання	23

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ. ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВПЧ -	вірусоподібні частинки
ДГ -	дегідрогенази
ДРС -	динамічне розсіювання світла
ІЧ- спектроскопія -	інфрачервона спектроскопія
МКС -	Міжнародна космічна станція
МКК -	мікробна культура комбучі
ПМВ -	позаклітинні мембранні везикули
ЧЧЦ -	чорний чай з цукром
ATR-FTIR-	ІЧ-спектроскопія порушеного повного відбиття з перетворенням Фур'є
EMSA -	зсув аналізу електрофоретичної рухливості
PBS -	фосфатно-сольовий буфер
вМКК	мікробна культура комбучі, яку експонували на верхньому рівні носія на платформі EXPOSE-R2
нМКК	мікробна культура комбучі, яку експонували на нижньому рівні носія на платформі EXPOSE-R2
сМКК	мікробна культура комбучі, яку експонували на середньому рівні носія на платформі EXPOSE-R2

ВСТУП

Ідея застосування комбучі для розробки пробіотиків/синбіотиків (синбіотик - поєднання пробіотика і пребіотика або харчових волокон) з метою їхнього виготовлення у місці мешкання екіпажами космічних, полярних, субмаринових та ін. експедицій виникла у 2010 р. (Kozyrovska, Foing, 2010) і повільно просувається у дослідженнях ІМБГ у межах міжнародного проекту Європейського космічного агентства - BIOMEX (Kozyrovska et al., 2012; Kukhareno et al., 2012; Ovcharenko et al., 2013; Zaets et al., 2014; Kharina et al., 2015, Reva et al., 2015; Podolich et al., 2017a, b; Zaets et al., 2016). Проте, безпечність мікроорганізмів завжди буде викликати питання. За нашою концепцією, до моменту повного доведення безпечності пробіотиків у місіях, тимчасовим вирішенням цієї проблеми буде використання *постбіотиків*, а саме готових продуктів живих мікроорганізмів, які несуть всі вигідні компоненти пробіотиків без прямого впливу живих мікробів. Постбіотики виробляються як продукти процесу ферментації, який здійснюється пробіотичними мікроорганізмами, отже, пробіотична культура комбучі залишається перспективним об'єктом дослідження як джерело корисних постбіотиків. Для космонавтів, що страждають запальними станами кишківника, застосування постбіотиків може бути альтернативою використання живих бактерій (у пробіотичній формі). Один з компонентів постбіотиків є позаклітинні мембранні везикули (ПМВ). ПМВ – є найбільш перспективними, оскільки ПМВ виконують ті ж функції, що й клітини, але не мають властивості розмножуватися. Окрім того, завдяки властивостям ПМВ проникати в усі типи клітин, на їхній основі за допомогою біоінженерних підходів можна створити смарт-перевізники (вектори) різних лікувальних факторів, які будуть проникати виключно у певні клітини і тим самим корегувати процес лікування, у залежності від наповнення. ПМВ відносно пластичні для маніпуляцій з боку генної інженерії продуцентів чи хімічної кон'югації самих везикул. Ліки можна завантажувати всередину ПМВ, уміщувати у міжмембранний простір чи робити поверхневі та трансмембранні конструкції.

Окрім везикул, живі клітини можуть виділяти у довкілля *вірусоподібні частинки* (ВПЧ), серед яких зустрічаються частинки, які структурово нагадують віріони, але є неінфекційними через відсутність вірусного генома. Вірогідність утворення ВПЧ у стресових умовах зростає.

Завданням 1 етапу проекту було дослідження складу популяцій позаклітинних мембранних пробіотичної мультимікробної культури комбучі (МКК) за умов перебування її у нормальних та стресових умовах та визначення вірусоподібних частинок у культурі комбучі.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Стабільні симбіотичні мікробні угруповання в якості перспективних екосистем для космічних досліджень

Культура комбучі (*Medusomyces gisevii* Lindau) являє собою симбіотичну культуру бактерій та дріжджів, відому як "чайний гриб" або чай Комбуча. Мікроорганізми Комбучі співіснують у взаємозалежних симбіотичних відносинах: в процесі бродіння в солодкого чаю дріжджі перетворюють цукор на органічні кислоти і етиловий спирт, а бактерії використовують останній для синтезу целюлозних волокон, утворюючи медузоподібне тіло-зооглею. Бактерійна целюлоза, синтезована *Glucanacetobacter hansenii* та іншими оцтовокислими бактеріями, є хімічно чистою, вільною від лігніну і геміцелюлози. Волокна мікроцелюлози можуть мати кілька варіантів практичного застосування в нанобіотехнології і біомедицині. Нарешті, МКК створює приємний солодкуватий кислий газований напій в аеробних умовах. Органічні кислоти, етиловий спирт і антибіотики і захищають МКК від колонізації іншими мікроорганізмами. Види дріжджів, виявлені в культурі комбучі можуть варіювати і включають *Brettanomyces/Dekkera*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia* та ін. (Danielian, 1957). Кілька видів оцтовокислих бактерій, таких як целюлозо-утворюючий *G. hansenii* (раніше *xylinus*), *G. kombuchae* sp. nov. є найбільш відомими видами, виділеними з різних екотипів Комбучі (Dutta, Gachhui, 2007).

Мікроорганізми комбучі продукують суміш різних метаболітів: клітковину, органічні та амінокислоти, вітаміни, антиоксиданти, ферменти, незамінні елементи (Danielian, 1957). Потенційний вплив метаболітів МКК на здоров'я людини викликав підвищений інтерес до напоїв комбучі. Найбільшою перевагою комбучі є його здатність до детоксикації і збадьорення організму, покращення травлення, стимулювання імунної системи. Чай комбучі відомий дуже давно, проте, науковий інтерес до МКК підвищився на початку минулого століття. Завдяки зусиллям багатьох наукових колективів, було доведено позитивний ефект культури комбучі на імунологічну, ендокринологічну, серцево-судинну, травну, сечостатеву та інші системи (див. Danielian, 1993). Широке розповсюдження синтетичних фармацевтичних препаратів відвернула увагу від дії напоїв комбучі. На початку цього тисячоліття ми спостерігали відродження комбучі у зв'язку з поступовим поверненням до натуральних здорових продуктів, а також науково-дослідну діяльність на фоні функціонального дослідження харчування. Останні добре описані науково-дослідні роботи виявили антимікробну та антипроліферативну дію напою Комбучі; зміцнення здоров'я після окисного стресу і цитотоксичності, індукованих забруднювачами навколишнього середовища; боротьбу з ожирінням, гіпохолестеролемією; антиоксидантну і ранозаживляючу дію; захист від хромосомних аберацій, індукованих гамма-випромінюванням;

гепатопротекторну дію. Захисна і антипроліферативна дія, імуномодуляція і т.д. привернули увагу до мікробного угруповання Комбучі як перспективного продукту для використання в несприятливих умовах.

1.2. Практичне використання мікробної культури комбучі (МКК) у космічній галузі

1.2.1. Цінний синбіотик.

Робота в екстремальних умовах (шахти, підводні човни, полярні експедиції космічної станції та ін.) потребує міцної імунної системи і збалансованої кишкової мікрофлори. У поєднанні з різкими змінами харчового раціону та жорсткими санітарними умовами, в яких живуть екіпажі, стан колонізації їх кишечника нормальною мікрофлорою може змінитися. Захисні комменсали та мутуалісти кишечника можуть зникнути, що призведе до вторинної інфекції мікробами-антагоністами, завжди присутніми в кишечнику, і може мати великі наслідки для здоров'я, такі як поява схильності до алергії і аутоімунних захворювань. Може бути доречною корекція пробіотиками та пребіотиками. *Пробіотики* (живі мікроорганізми, які при введенні в достатніх кількостях надавати допомогу при захворюванні господаря, Всесвітня організація охорони здоров'я та Продовольча і сільськогосподарська організація Об'єднаних Націй) є необхідними для створення і підтримки оптимального імунітету. Слід відзначити, що застосування пробіотиків є ефективним, якщо в раціоні наявні неперетравлювані продукти. Саме тому ми нагально рекомендуємо *пребіотики* (компоненти їжі, які вибірково стимулюють ріст і/або активність корисних мікроорганізмів прямо в кишечнику людини), і разом з пробіотиками ці добавки сформують *синбіотики* (комбінація пробіотиків і пребіотиків).

Час з'ясувати, як використовувати пробіотики у харчуванні космонавтів. Екстремальна гігієна, вплив зовнішніх стресів, психо-емоційних розладів в агресивному середовищі може призвести до дисбіозу та імунного дисбалансу. Крім того, дієта астронавтів недостатньо збагачена розчинними і нерозчинними волокнами, і з традиційні пробіотики можуть виявитися не настільки ефективними. Чай/тіло комбучі може бути перспективною формою синбіотика для екстремальних експедицій з кількох причин. Перш за все, культура комбучі є джерелом пробіотичних бактерій та дріжджів, а також волокон мікроцелюлози - пребіотиків, які допомагають стимулювати ріст корисних мікроорганізмів в шлунково-кишковому тракті. По-друге, МКК забезпечує коротко-ланцюговими жирними кислотами (ацетатом, бутиратом, пропіонатом та іншими метаболітами), які підвищують імунітет. Нарешті, МКК є багатим джерелом вітамінів групи В, С, а також інших біологічно активних сполук та необхідних мінералів. Крім того, перероблене *in situ* медузо подібне тіло-зооглея

МКК, збагачене грубим мікрОВОЛОКОМ, полісахаридами і білком буде служити постійним джерелом їжі для екіпажу і тварин.

1.2.2. Переваги МКК в якості пробіотика

Різноманітність природних симбіотичних мікроорганізмів і відповідно широкий спектр їх активності є перевагою МКК над пробіотиками, що складаються з одного штаму чи штучно скомпонованою сумішшю корисних штамів мікроорганізмів. Завдяки біоплівці, культура-закваска комбучі практично безсмертна і може бути активована за потреби. Це означає, що МКК не має терміну придатності, і це, мабуть, головна його перевага. Повільно ростучі біоплівки утворюють значну кількість персистерів (субпопуляції сплячих клітин), які переносять несприятливі фактори. Культура комбучі проявляє метаболічну пластичність і може бути адаптована до різних економічно обґрунтованих харчових джерел. МКК можна легко, безпечно, недорого і нетрудоємко відтворити *in situ* (вдома, при польотах, на форпостах і т.п.). Важливо зазначити, що кінцевий продукт Комбучі, злегка газований кисло-солодковатий напій, що нагадує сидр і шампанське, являє собою продукт, який крім позитивного впливу на здоров'я створює також позитивні емоції.

На додаток до пробіотика для екіпажу, культура комбучі є перспективним пробіотиком для вирощування рослин (Danielian, 1993). Здатність вирощувати рослини у позаземних теплицях є практичною необхідністю для створення розвиненої системи життєзабезпечення людей. Рослини будуть забезпечувати дослідників, які живуть в пілотованих позаземних базах, свіжими продуктами, киснем і чистою водою. Концепція вирощування першого покоління рослин на місячній базі передбачає, що вони відіграватимуть вирішальну роль у формуванні протогрунту прийнятної родючості, необхідного для цільового вирощування другого покоління рослин (пшениці, рису і т.д.) з низькими витратами (Kozyrovska et al., 2011). Залишки першого покоління рослин можна компостувати і разом з місцевим реолітом перетворити за допомогою мікроорганізмів в ґрунтоподібний субстрат в циклі регенеративної системи життєзабезпечення. Використання постійного джерела органіки, яким є тіло МКК пригодиться для формування протогрунту. Ферментна система дріжджів *Dekkera*, активних складових МКК, досить потужна, щоб деградувати рослинні полімери. В найближчому майбутньому, доречно застосувати метаболічну інженерію мікробіоти комбучі з метою поліпшити їх пряму взаємодію з рослинними рештками. Для цих цілей буде сконструйовано нові комплексні стабільні синтетичні екосистеми, які складаються зі штамів дріжджів і бактерій. Як природний, так і генетично-перебудований мікробіомом комбучі буде незамінним компонентом регенеративної системи життєзабезпечення.

1.2.3. Постбіотик

1.2.3. 1. Позаклітинні мембранні везикули як компонент секретому МКК

У цьому проекті позаклітинні біонаноструктури визначаються як утворені живою клітиною нанорозмірні структури та виділені у позаклітинний простір для виконання біологічних цілей. Останніми роками усе більше уваги приділяється дослідженню ролі *позаклітинних мембранних везикул* (ПМВ), які набувають значення через практичне застосування у діагностиці і лікуванні захворювань. Виділення сферичних білково-ліпідних ПМВ (30-500 нм) клітинами спостерігається в організмів з усіх трьох гілок дерева життя, що охоплюють як прокариотів, так і еукаріотів: грамнегативних і грампозитивних бактерій, археїв, грибів і паразитів (на рис. 1.1 показано нановезикули бактерій).

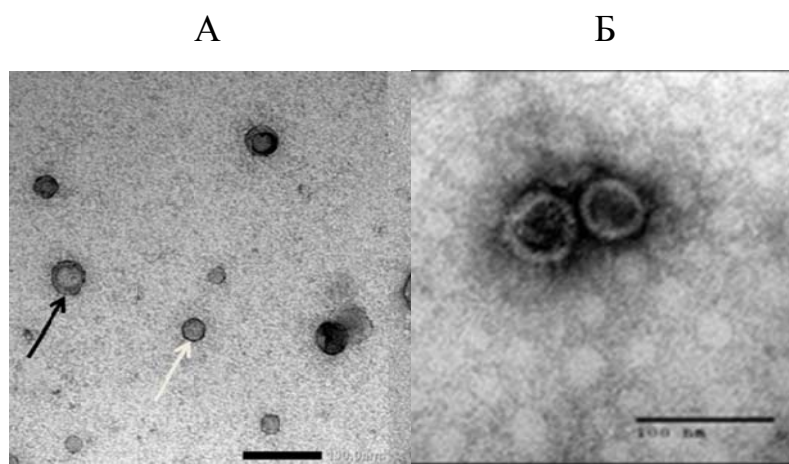


Рис. 1.1. Зовнішньо-мембранні везикули бактерій культури комбучі (Kharina et al., 2015) (А). Вірусоподібні частинки (Fontana et al., 2015) (Б)

ПМВ переносять між клітинами мембранні і цитоплазматичні білки, ДНК, різні класи РНК, ліпіди, АТФ та інші біоактивні молекули. Функції ПМВ полягають, в основному, у міжклітинному сигналінгу, що регулює фізіологічні процеси, та переносі вантажу (молекулярного вмісту), що може бути засобом знищення або джерелом живлення клітин макроорганізму, у т.ч. пухлинних. Це означає, що везикули можуть впливати як на здорові, так і на змінені клітини. ПМВ також залучено до вірусної інфекції, де вони працюють як важлива система міжклітинного зв'язку між зараженими та неінфікованими клітинами. Дійсно, через їх загальні шляхи біогенезу, ПМВ та віруси вважаються близькими родичами (Bello-Morales, López-Guerrero, 2018; Nolte-'T Hoen et al., 2016), а ПМВ, виділені інфікованими клітинами, можуть або посилювати вірусний потік, або, навпаки, викликати протівірусну відповідь. Дві основні біологічні дії ПМВ під час вірусних інфекцій - це перенесення геномів вірусу в клітини-мішені та втручання в фізіологію клітин для полегшення інфекції. Отже, теоретично, ПМВ можуть приносити макроорганізму як користь, так і шкоду.

ПМВ потрапляють в організм людини у великій кількості з ферментованими продуктами харчування домашнього та фабричного виготовлення, що споживаються з метою зміцнення здоров'я, а також з пробіотиками (Aguilera et al., 2014). ПМВ, які попадають в організм людини, потребують вивчення і контролювання.

Клітини виділяють декілька типів мембранних нанорозмірних везикул з різними фізіологічними властивостями, які включають екзосоми, мікровезикули і апоптичні тільця (van Niel et al., 2018). Екзосоми є найменшими (30-100 нм), мають ендоцитне походження і попадають у позаклітинне середовище з мультивезикулярних утворів (multivesicle bodies), сформованих усередині еукаріотичної клітини з мембран. Мікровезикули мають діапазон розмірів від 60 до 1000 нм і формуються через зовнішнє «брунькування» клітинної мембрани. Нарешті, великі комплексні везикули – апоптичні тільця (від 500 нм до 2 мкм) - секретуються через механізм екзоцитозу відмираючими клітинами. Отже, біогенез у них різний, але усі вони утворені фосфоліпідними мембранами і виділяються клітинами назовні. Теоретично, гетерогенні популяції ПМВ виробляються усіма видами клітин і є присутніми у рідинах тіла, вбираючи кров, слину, слюзи, сечу, спинномозкову рідину, грудне молоко та сперму. ПМВ не здатні до самовідтворення, не мають метаболізму, але переносять ліпіди, білки (фактори росту, ферменти, рецептори тощо), нуклеїнові кислоти (мРНК, міРНК, ДНК) та інші біоактивні молекули з однієї клітини в іншу, у тому числі, на далекій відстані, долаючи гематоенцефалічний бар'єр. ПМВ розглядаються як медіатори паракринних сигналів, які поширюються між клітинами через взаємодію ліганд-рецептор або доставку вмісту везикул після приєднання або поглинання клітинами-реципієнтами (Tao et al., 2018). Горизонтальна передача генетичної інформації через ПМВ індукує тимчасові або постійні зміни фенотипу клітин і впливає на експресію генів у клітинах-мішенях. Малі некодуючі РНК, що переносяться везикулами, є ключовими модуляторами біологічних ефектів у таргетних клітинах. Завдяки унікальним властивостям, ПМВ стали привабливим об'єктом досліджень відновлювальної медицини як перспективний метод лікування широкого кола хвороб та незагоювальних ран (Akao et al., 2011; Tao et al., 2017; Xu et al., 2018).

1.2.3.2. Переваги МКК як постбіотика

Існує багато небезпек, які мікроби надають для здоров'я людини (тварин) (токсини, ферменти тощо). Існує також багато способів та інструментів для розпізнавання цих небезпек (ідентифікація мікробів, токсинів, ферментів тощо з "omics"). Однак невелика увага приділяється мікробним позаклітинним мембранним везикулам як транспортним засобам, що переносять небезпечні молекули. ПМВ - це нанорозмірні мембранні сфери, виділені мікроорганізмами, які несуть молекулярні патерни та білки з батьківських мембран. ПМВ як носії будь-якого вразливого мікробного вантажу (мРНК, мікроРНК, ДНК, білки) потенційно можуть відігравати сурогатну роль клітини, яку вони отримують, наприклад, модулюють

реакцію цитокінів / хемокінів епітеліальних та імунних клітин або посилюють бар'єрну функцію в кишкових епітеліальних клітинах. Консервативність механізму виділення і функціональність везикул у представників усього дерева життя підкреслює важливість везикул у біогічних процесах. У той же час, у деяких випадках ПМВ можуть становити ризик передачі факторів вірулентності макроорганізму (наприклад, ферментів, ДНК та дрібних РНК) на клітини, що може призвести до пошкодження клітин та апоптозу; виникнення імуногенних антигенів або регуляторних факторів, що посилюють бар'єрну функцію кишкових епітеліальних клітин. Навіть ПМВ пробіотичних бактерій можуть бути пов'язані з небезпечними ефектами за певних обставин (Cañas et al., 2016).

1.2.3.3. Оцінка ризиків МКК : визначення вірусоподібних частинок

Окрім везикул, живі клітини можуть виділяти у довкілля *вірусоподібні частинки* (ВПЧ), серед яких зустрічаються частинки, які структурово нагадують віріони, але є неінфекційними через відсутність вірусного генома (Zeltins, 2013) і, власне, *інфекційні вірусні частинки*, наприклад, *бактеріофаги* у бактерій.

ВПЧ, в основному, мають розміри в діапазоні від 20 до 100 нм в діаметрі (див. рис.), які дозволяють вільний вхід в лімфатичні судини, а також упізнання і поглинання різними клітинами, що представляють антигени (Manolova et al., 2008). ВПЧ мають імуномодулюючі властивості, так як вони складаються з капсидних білків, які можуть ініціювати імунну відповідь, у т.ч., здатність активувати В-клітини і викликати надійні і довгострокові відповіді антитіл. У свою чергу, ці дві особливості ВПЧ можуть бути використані при створенні безпечних та ефективних вакцин. На початку 1990-х років, розроблено стратегію для адресної доставки ліків на основі ВПЧ (Mastico et al., 1993) і успішно застосовують платформи ВПЧ бактеріофагів, наприклад, для цільового доправлення міРНК проти відомої пухлинної мішені, транскрипту Vcl-онкогену (Galaway, Stockley, 2013). Якщо ВПЧ буде знайдено у культурі комбучі, необхідно буде визначити безпечність цих наноструктур для макроорганізму. Слід відмітити, що станом на сьогоднішній день в дослідженнях взаємовпливу везикул і вірусних частинок існує істотна прогалина, і наслідки такої взаємодії для макроорганізму важко передбачити. Варто розглядати сценарії як синергічної дії позаклітинних наночастинок, так і їхніх антагоністичних взаємовпливів. Концептуально нове сприйняття вірусів та їх роль у еволюції життя запропонував Moelling (2013). Відповідно до цієї теорії, лише невелика частина вірусів є суворими патогенами, що викликають специфічні захворювання або рак, тоді як більшість вірусів існують у навколишньому середовищі як збалансована екосистема і значно сприяють еволюції ояк окремої клітини, так і багатоклітинних організмів. Наші дослідження дозволять пролити світло на процеси взаємодії різних типів біонаноструктур у модельній системі комбучі.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Мікроорганізми

Культуру мікроорганізмів комбучі *Medusomyces gisevii* Lindau IMBG1 було отримано з колекції мікроорганізмів Інституту молекулярної біології та генетики (Київ, Україна). МКК-IMBG1 зі стерильного солодкого чайного середовища включає культивовані види дріжджів *Pichia* sp., *Dekkera anomala*, *Zygosaccharomyces bailii*, та бактерій *Komagataeibacter saccharivorans*, *K. intermedius* та *Gluconobacter oxydans*. Також виявлено некультивовані види мікроорганізмів, *e.g.*, *Bacillus* spp. (Reva et al., 2015).

2.2. Культуральні середовища та умови культивування

МКК вирощували на стерилізованому фільтруванням чорному чаї (*Camellia sinensis*) (Lipton, 1.2%, w/v) з додавання білого цукру (3%, w/v) (ЧЧЦ). рН цього культурального середовища знижували до 2.9 за допомогою оцтової кислоти. Культивування виконували при t 28°C в стаціонарних умовах. За потреби додавали стерилізований шляхом автоклавування яблучний сік (до кінцевої концентрації у середовищі 3%).

Для вирощування бактерій використовували поживні середовища А, LB (Миллер, 1976), та HS (Hestrin and Schramm, 1954), а для культивування дріжджів - Glucose Yeast Peptone medium (HiMedia Laboratories, India). Під час процедури виділення використовували антибіотики циклогексिमід (100 мкг/мл, Sigma-Aldrich) проти дріжджів та цефтріаксон (50 мкг/мл, Roche Biochemicals) проти бактерій.

2.3. Виділення та візуалізація позаклітинних мембранних везикул (ПМВ) та бактеріофагів з космічних зразків

Культуру комбучі (3-7 добову) центрифугували при 17,000 rpm протягом 20 хв при 4°C. Надосад відбирали та повторно центрифугували на ультрацентрифузі при 100,000 g протягом 1 год при 4°C (Beckman Instruments Inc., L8M, rotor 55.2 Ti). Отриманий осад ресуспендували у стерильному фосфатно-сольовому буфері (PBS). Препарати везикул фільтрували через мембранні фільтри з діаметром пор 0,20 мкм (Minisart, Sartorius, Germany) перед візуалізацією чи вимірюванням розмірів.

Для скануючої електронної мікроскопії зразок (2 μ l, 2 мг/мл білка) наносили на покриті формваром мідні сіточки та контрастували 2.0% водним ураніл-ацетатом протягом 30 с та висушували у темряві протягом 20 хв (реагенти Serva, Germany). Зразки аналізували на скануючому електронному мікроскопі Mira 3 LMU (Tescan s.r.o., Czech Republic), використовуючи STEM detector в режимі високої яскравості при різному збільшенні та підсиленій до 10 кВ напрузі.

Бактеріофагоподібні частинки та ПМВ у зразках візуалізували під електронним мікроскопом JEM-1400 (Jeol Inc., Японія). Покриті формваром мідні сіточки занурювали у зразок, а потім контрастували 2,0% водним розчином ураніл-ацетату протягом 30 с та висушували у темряві протягом 20 хв (реагенти Serva, Germany). Зразки аналізували при збільшенні 90 000 при напрузі 80 кВ.

Розмір ПМВ вимірювали за допомогою методу динамічного розсіювання світла (ДРС) (Zetasizer Nano ZS), статистичну обробку проводили на програмному забезпеченні Zetasizer (Malvern Instrumental Ltd).

2.4. Дослідження ПМВ з космічних зразків

2.4.1. ІЧ-спектроскопія порушеного повного відбиття з перетворенням Фур'є (ATR-FTIR)

Абсорбційні спектри зразків ПМВ аналізували за допомогою ATR-FTIR, щоб отримати інформацію про макромолекулярний склад матеріалу. Метод ATR дозволяє збільшити товщину досліджуваного матеріалу завдяки множинному відбиттю променя від поверхні призми. Зразки ПМВ (0,2-0,3 μl , 2 мг/мл білка) в PBS (рН 7.4) наносили на призму KRS-5 та накривали другою призмою. Вимірювання проводили на ІЧ-спектрофотометрі Bruker-113v Fourier Transform spectrometer при кімнатній температурі в діапазоні 500 – 4000 cm^{-1} з спектральною роздільною здатністю 1,0 cm^{-1} . Точність позиції лінії $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

2.4.2. Визначення генотоксичності

Геномну ДНК *E.coli* (концентрація 150 нг/мкл) інкубували протягом 24 год при 37⁰С з везикулами таких варіантів:

1. Контроль 1 (ДНК без обробки, зберігали в морозильній камері)
2. Контроль 2 (20 мкл ДНК + 5 мкл PBS → інкубування при 37⁰С протягом 24 год)
3. 20 мкл ДНК + 5 мкл везикул *K.saccharivorans* (концентрація 3,5 мг/мл) → інкубування при 37⁰С протягом 24 год
4. 20 мкл ДНК + 5 мкл везикул top КМС (концентрація 3,2 мг/мл) → інкубування при 37⁰С протягом 24 год
5. 20 мкл ДНК + 5 мкл везикул middle КМС (концентрація 3,6 мг/мл) → інкубування при 37⁰С протягом 24 год
6. 20 мкл ДНК + 5 мкл везикул bottom КМС (концентрація 3,5 мг/мл) → інкубування при 37⁰С протягом 24 год.

2.4.3. Визначення зміни електрофоретичної рухливості (EMSA)

EMSA є швидким і чутливим методом детекції комплексоутворення нуклеїнових кислот (Garner, Revzin, 1986). Позаклітинні везикули (5 мг/мл) суспендували в PBS (рН 7.4) та фільтрували (0.20 μM). Різні концентрації ПМВ додавали до константної кількості (300 нг) pTZ19R* DNA (Fermentas, Lithuania) або її EcoRI-лінеаризованої форми, кінцеву реакційну суміш (20 μl) інкубували протягом 1 год при 37°C у обробленій DEPC-воді. Після інкубування зразки розділяли електрофорезом в 1.2% агарозному гелі в TAE буфері. Всі експерименти проводили в однакових мовах у трьох повторностях. Взаємодію ПМВ з ДНК визначали за нижчою рухливістю їх комплексів у гелі.

2.4.4. Визначення активності дегідрогеназ (ДГ, ЕС 1.1)

МТТ-тест за допомогою 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій броміду (Chekulayeva et al., 2000) з деякими змінами використовували для визначення дегідрогеназної активності ПМВ. Зразки ПМВ (0,1 мл, 4-5 мг/мл білка) в PBS інкубували з 0,01 мл розчину МТТ в PBS (2 мг/мл) протягом 2,5 годин при 37 ° С. Після інкубації зразки центрифугували при 8000 \times g протягом 2 хв. Гранули формагану розчиняли в 0,01 мл ДМСО. Оптичне поглинання перетвореного барвника вимірювали при 570 нм. Коефіцієнт молярної екстинкції для МТТ-формагану в ДМСО, необхідний для розрахунку його вмісту у зразках, становив $1,35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Результати виражали в мМмоль утвореного формагану mg^{-1} білка h^{-1} .

2.4.5. Статистична обробка даних

Результати наводили у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення, де кожне значення є середнім для трьох повторностей реакції. Вірогідність різниці між групами оцінювали за допомогою критерію Стюдента при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Метавезикулом МКК

Нативна культура комбучі має популяції ПМВ, які продукують кілька видів бактерій та дріжджів, в діапазоні від 20 до 200 нм, де 6-7 популяцій складають 50% везикулому, і популяції 141 та 164 нм є домінуючими. Після оживлення, зразок МКК лабораторного контролю продукував везикулом, основними популяціями подібний до нативної комбучі, хоча він має менше варіацій, без фракцій невеликих розмірів. Везикули зі зразків вМКК, сМКК, та нМКК виділяли та тестували після появи целюлозної плівки (2 місяці після інокуляції зразків) та порівнювали після серії пасажів протягом наступних 5 місяців. Перед пасажами ПМВ з вМКК були охарактеризовані, як фракції малого розміру (13-50 нм), так і 3 великі популяції (122, 141 та 164 нм). Зразки нМКК не мають фракції везикул малого розміру, а дві основні популяції були 164 та 190 нм, тобто спотерігався зсув середніх розмірів. Після серії пасажів, вМКК все ще продукувала ПМВ меншого розміру (20-50 нм), порівняно з нативною МКК. Зразки нМКК та сМКК відрізнялися менш складною структурою везикулому.

Популяції везикул візуально спостерігали за допомогою скануючої електронної мікроскопії (рис. 3.1).

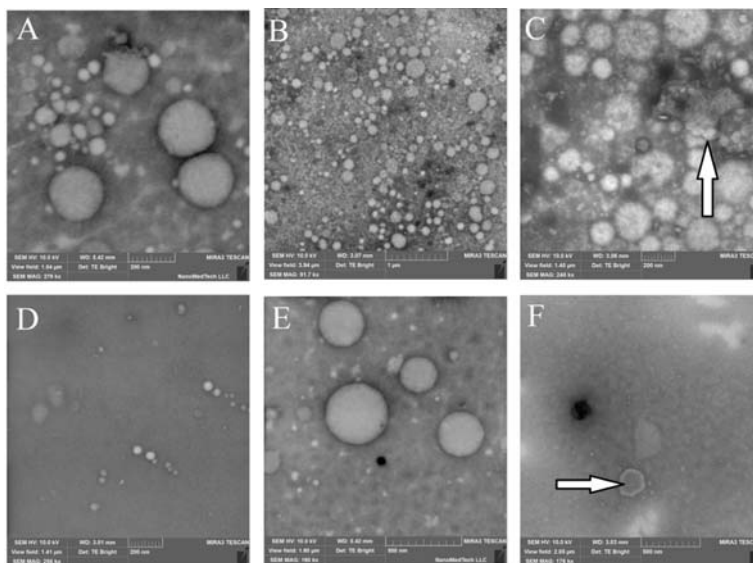


Рис. 3.1. Скануючи електронна мікроскопія позаклітинних мембранних везикул (ПМВ). Верхній ряд: популяції ПМВ нативного мультимікробного угруповання комбучі (МКК) (A); популяції ПМВ МКК, яку експонували на верхньому рівні носія на платформі EXPOSE-R2 (B, C) (агрегацію ПМВ показано стрілкою). Нижній ряд: популяції ПМВ нМКК, експонованої на нижньому рівні (D); популяції ПМВ МКК, яка перебувала в лабораторії під час політного космічного експерименту (E); деформація зовнішньої мембранної везикули з нМКК(відмічено стрілкою) (F).

Результати, представлені на (рис. 3.1 А-Е) у цілому співпадають з результатами, отриманим з ДРС для кожного варіанта МКК. Проте, на рис. 3.1 А-С видно злиті везикули; лабораторний контроль (рис. 3.1 Е) формував утворення розміром 500 нм та більше. Більшість досліджених популяцій везикул очевидно мали одну мембрану, однак були виявлені зовнішньо- внутрішні бактеріальні везикули (рис. 3.1 F). Деякі деформації везикул та їх агрегації спостерігали у препаратах, виділених з експонованих зразків МКК (рис. 3.1 С, F).

3.2. Зміни у клітинних мембранах везикул експонованих зразків

У спектрах поглинання ATR-FTIR ПМВ експонованої до імітованих марсіанських умов культури комбучі отримано загальну інформацію щодо молекулярних складових, що є спільними для живих організмів: основні смуги поглинання ідентифіковані як пов'язані з білками / ліпопротеїдами ($1550-1660\text{ cm}^{-1}$), ліпідами ($2880-2950\text{ cm}^{-1}$) та вуглеводами ($925-1111\text{ cm}^{-1}$) (рис. 3.2).

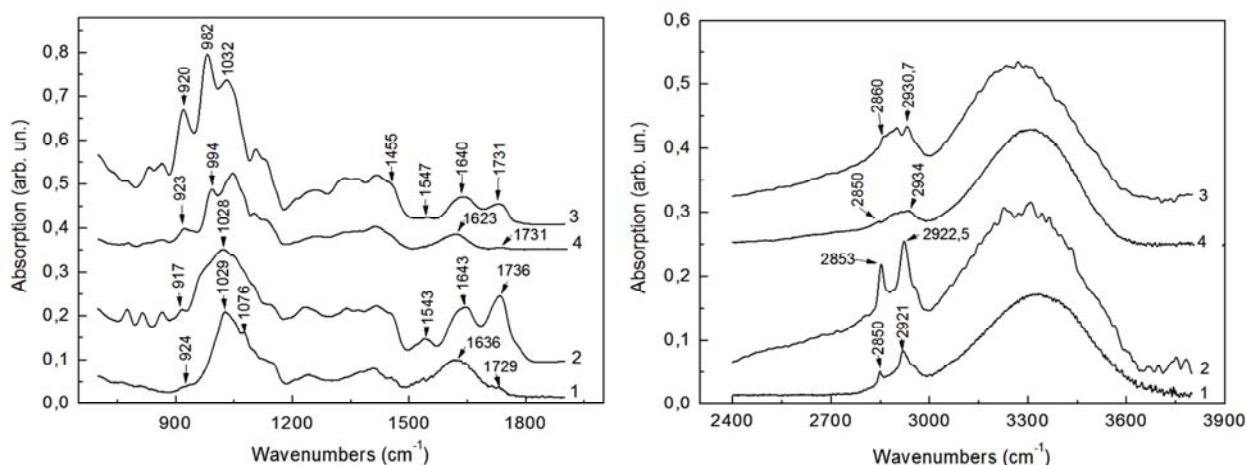


Рис. 3.2. Фрагменти спектрів поглинання ATR-FTIR ($400-4000\text{ cm}^{-1}$) позаклітинних мембранних везикул (ПМВ). 1 – ПМВ мікробної культури нативної комбучі (МКК); 2 – ПМВ відновленої комбучі після експонування на верхньому рівні носія; 3 - ПМВ відновленої комбучі після експонування на нижньому рівні носія; 4 - ПМВ відновленої комбучі після експонування на верхньому рівні носія та серії культивувань.

Значні зміни у спектрах спостерігали в діапазоні $2820-2950\text{ cm}^{-1}$ (метиленові групи амінокислот чи жирних кислот), $1570-1740\text{ cm}^{-1}$ (амід I, амід II, C=O групи), та $900-1150\text{ cm}^{-1}$ (вуглеводис, алкени, амінокислоти) для зразків після впливу космічних факторів, порівняно з материнською культурою комбучі. Підвищення інтенсивності смуги близько 1731 cm^{-1} (ліпідна група C=O) було відмічено для ПМВ зразків вМКК та нМКК. Додаткові смуги поглинання з максимумом при ~ 982 (вуглеводи) та 920 cm^{-1} (алкени) були зареєстровані у ПМВ зразка нМКК, порівняно з ПМВ нативної МКК (рис. 3.2-3). Ці особливості були менш

вираженими у зразків з верхнього рівня (рис. 3.2-2). Симметричні вібрації розтягнення фосфатних груп (ймовірно, у складі фосфоліпідів або фосфодиефірних груп нуклеїнової кислоти) в ПМВ нативної МКК мали максимум поглинання при 1076 см^{-1} і слабо проявлялися на спектрах ПМВ з МКК верхнього та нижнього рівнів. Характерні для ПМВ комбучі вібрації згинання (ножичне коливання) ліпідних ацил- CH_2 груп (1455 см^{-1}) ПМВ космічних зразків мали більшу інтенсивність, ніж у ПМВ нативної МКК. Уцілому, спостерігали зсуви більшості смуг поглинання експонованих зразків порівняно з нативною культурою комбучі, що свідчило про присутність внутрішніх стресів у зразках, які експонували до імітованих марсіанських факторів незалежно від їх розташування. Після серії пасажів культивування МКК, спектри ATR-FTIR ПМВ експонованих зразків стали більш подібними до контрольних, як, наприклад, видно на рис. 3.2-4.

3.3. Вплив позаклітинних везикул на ДНК бактерій

3.3.1. Взаємодія з плазмідною ДНК *E.coli*

Електрофоретичні паттерни показали, що при концентраціях ПМВ в діапазоні 125,0-12,5 нг, можливо сформувалися комплекси ПМВ-ДНК, які демонстрували меншу рухливість в агарозному гелі порівняно з контрольною ДНК (рис. 3.3 - 1-6, верх). Зміни в мембранах ПМВ з експонованих у космосі зразків МКК, імовірно, полягали у зміні поверхневого заряду і здатність зв'язувати ДНК була втрачена частково або повністю. Що стосується генотоксичних параметрів, то ПМВ не викликають ушкодження плазмідної ДНК.

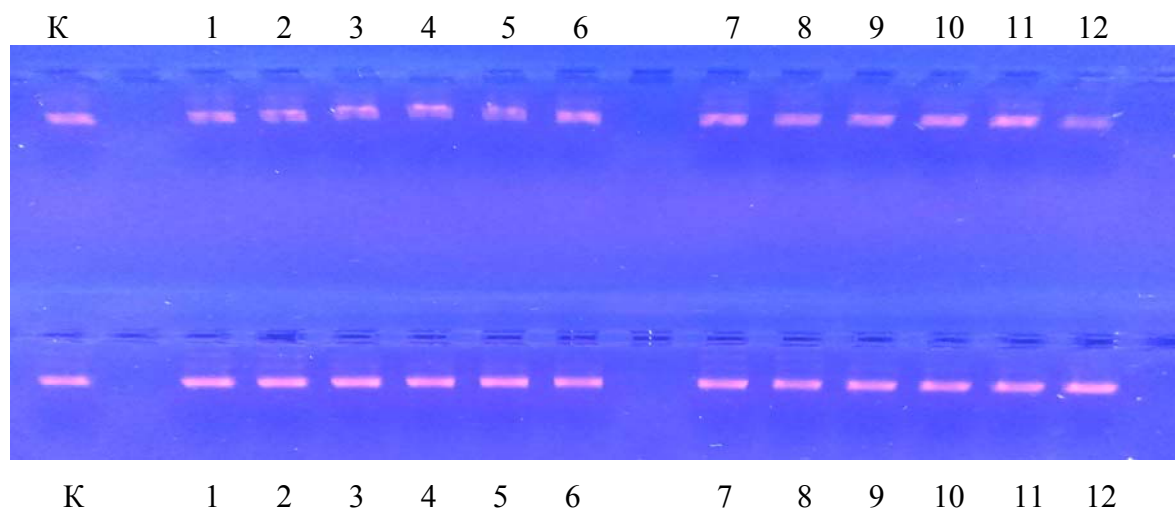


Рис. 3.3. Електрофоретичне розділення плазмідної ДНК pTZ19R* *E.coli*, обробленої везикулами, виділеними з культури комбучі після експонування на МКС. Верхня панель: 1-6 – інкубування з лабораторним екотипом комбучі; 7-12 – ПМВ комбучі з нижнього рівня. Нижня панель: 1-6 – ПМВ комбучі з горішнього рівня; 7-12 - ПМВ комбучі з середнього рівня. К – контрольний препарат ДНК плазмід.

3.3.2. Взаємодія з геномною ДНК *E.coli*

Електрофоретичні паттерни показали, що геномна ДНК *E.coli* пошкоджується вірогідно екзонуклеазами, асоційованими з везикулами нативного екотипу комбучі, а також космічних зразків з верхнього та середнього рівнів (рис. 3.4). ПМВ з МКК верхнього рівня не пошкоджувалися, ймовірно через втрату ферменту.

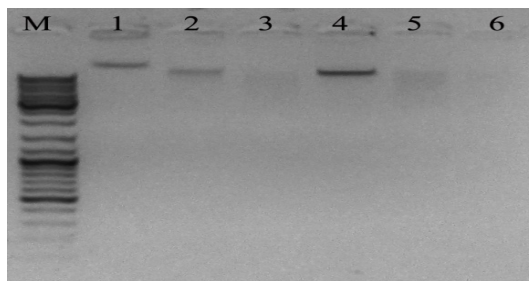


Рис. 3.4. Електрофоретичне розділення ДНК *E.coli*, обробленої везикулами, виділеними з культури комбучі після експонування на МКК. 1 – ДНК *E.coli* без інкубування; 2 - ДНК *E.coli*, інкубування у буфері; при 37°C; 3 - ПМВ *K.saccharivorans*; 4 - ПМВ з верхньої МКК; 5 – ПМВ з середньої МКК; 6 – ПМВ з нижньої МКК.

3.4. Дегідрогеназна активність мембранних везикул

Дегідрогенази - це ферменти, що відносяться до групи оксидоредуктаз, які окислюють субстрат шляхом перенесення протона та електронів через ланцюг проміжних переносчиків електронів (як правило, $NAD^+ / NADP^+$ або FAD / FMN) до кінцевого акцептора електронів (кисню), внаслідок чого утворюється вода. ДГ є фундаментальною частиною ферментних систем всіх мікроорганізмів, таких як ферменти дихальних ланцюгів, цикл Кребса, гліколіз, пентозофосфатний шлях та метаболізм N. Активність ДГ підвищувалася у всіх штаммах комбучі, отриманих з космічних зразків, 1,6 рази (вМКК), у 3 рази (сМКК) та 8,6 рази (нМКК) порівняно з контролем (рис. 3.5).

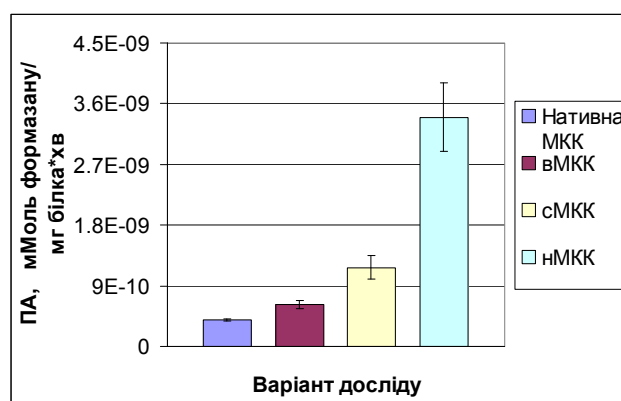


Рис. 3.5. Активність дегідрогеназ позаклітинних мембранних везикул культури комбучі після експонування на МКК: ПМВ мікробної культури нативної комбучі (Нативна МКК) та ПМВ відновленої комбучі після експонування на верхньому (вМКК), середньому (сМКК) та нижньому (нМКК) рівнях носія та серії культивувань.

Присутність дегідрогеназ, які можуть мати як мембранне, так і цитоплазматичне походження, таких як сукцинатдегідрогеназа, малатдегідрогеназа, гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа, аспартат-семиальдегід дегідрогеназа, інозин-5'-монофосфат дегідрогеназа, ізоцитратдегідрогеназа, підтверджена протеомними дослідженнями ЗМВ *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter jejuni*, *Mycococcus xanthus* та інших (Jang et al., 2014; Zakharzhevskaya et al., 2017; Evans et al., 2012).

3.5. Активація профагів МКК

Фаги можуть відігравати важливу роль при адаптації мікробіому до стресових середовищ (Wang et al., 2010). Близько 70% секвенованих геномів містять профаги (Paul, 2008). Короткохвильове УФ-опромінення і поглинання металів (наприклад, заліза) під час утворення біоплівки можуть викликати фаг-опосередкований лізис клітин (Binnenkade et al., 2014). Щоб перевірити це, культура, що виробляє целюлозу, *K. intermedius*, одного з ключових гравців у МКК, обробляли поліхроматичним УФ дозою 10 Дж / м². Ця процедура призвела до часткового лізису культури та утворення поодиноких дефектних фагових часток з морфологією *Muoviridae* (рис. 3.6 А). У старіючій МКК також були виявлені поодинокі дефектні бактеріофаги (рис. 3.6 Б). Серед ПМВ, виділених з культури комбучі, експонованої на МКС, зустрічаються поодинокі фаги (рис. 3.6 В).

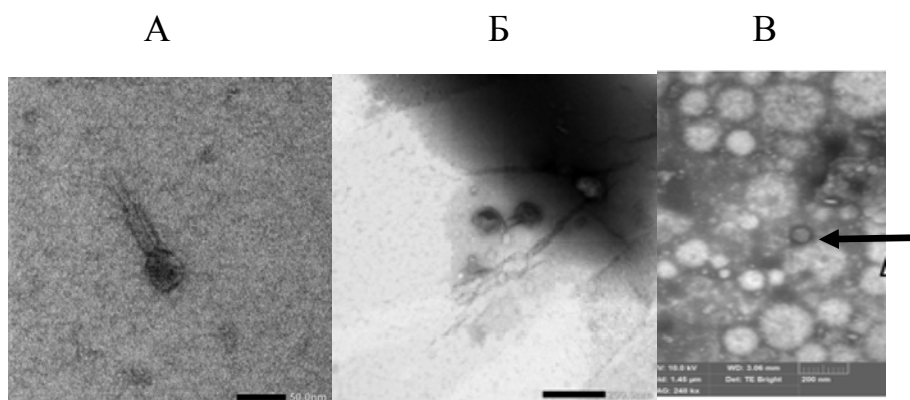


Рис. 3.6. Мікрофотографії (трансмисійна електронна мікроскопія), що ілюструють морфологію помірною бактеріофага, виявленого в *Komagateibacter intermedius* IMBG180 після обробки поліхроматичним УФ (А). У культурі старіючої комбучі (Б) був виявлений хвостовий бактеріофаг. Серед ПМВ, виділених з культури комбучі, експонованої на МКС, зустрічаються поодинокі фаги (позначено стрілкою) (В).

ВИСНОВКИ

Живі зразки плівки комбучі, експоновані на МКС на трирівневому носієві, дозволили виявити різницю між впливом імітованих марсіанських факторів на МКК на верхньому рівні та відфільтрованими факторами на "темних" нижніх рівнях. У після-політних аналізах метавезикулому МКК показано зміни клітинних мембран мікроорганізмів, визначених за даними аналізу ПМВ, а також появу поодиноких фагів. Наведені дані показали, що вплив імітованих марсіанських факторів на мікробні організми призводить до відмінностей між везикуломами нативної та експонованих культур комбучі, що може відображати різницю у міжвидових комунікаціях, пов'язаних з виживаністю та активностями під впливом різних факторів.

ПУБЛІКАЦІЇ ЗА ТЕМОЮ ПРОЕКТУ

1. Podolich O., Kukharenko O., Haidak A., Zaets I., Zaika L., StorozhukO., Palchikovska L., Orlovska I., Reva O., Borisova T., Khirunenkol., Sosnin M., Rabbow E., Kravchenko V., Skoryk M., Kremenskoj M., Demets R., Olsson-Francis K., Kozyrovska N., de Vera J-P. Multimicrobial Kombucha Culture Tolerates Mars-like Conditions Simulated on Low-Earth Orbit // *Astrobiology* (прийнято).
2. de Vera J.-P., Alawi M., Backhaus T., Baqué M., Billi D., Böttger U., Berger T., Bohmeier M., Cockell C., Demets R., de la Torre Noetzel R., Edwards H., Elsaesser A., Fagliarone C., Fiedler A., Foing B., Foucher F., Fritz J., Hanke F., Herzog T., Horneck G., Hübers H.-W., Huwe B., Joshi J., Kozyrovska N., Kruchten M., Lasch P., Lee N., Leuko S., Leya T., Lorek A., Martínez-Frías J., Moritz S., Moeller R., Olsson-Francis K., Onofri S., Ott S., Pacelli C., Podolich O., Rabbow E., Reitz G., Rettberg P., Reva O., Rothschild L., Sancho L. G., Schulze-Makuch D., Selbmann L., Serrano P., SzewzykU., Verseux C., Wadsworth J., Wagner D., Westall F., Wolter D. and Zucconi L. Limits of life and the habitability of Mars: The ESA space experiment BIOMEX on the ISS // *Astrobiology* (прийнято)
3. de Vera J.-P., Baqué M., Billi D., Böttger U., Bulat S., Czupalla M., Dachwald B., de la Torre R., Elsaesser A., Foucher F., Korsitzky H., Kozyrovska N., Läufer A., Moeller R., Olsson-Francis K., Onofri S., Sommer S., WagnerD., Westall F. The search for Life on Mars and in the Solar System - Strategies, Logistics and Infrastructures // *Proceedings of 69th International Astronautical Congress (IAC) (1-5 October 2018, Bremen, Germany)* (прийнято)
4. Orlovska I., Zaets I., Podolich O., Kukharenko O., Zubova G., Khirunenkol., de Vera J.-P., Kozyrovska N. Bacterial cellulose in the space and Mars-like environment: a putative biosignature and promising material // *Abstracts 18 Ukrainian conference on Space Research (17-20 вересня, 2018, Київ, Україна)*, с. 64.
5. Kozyrovska N., Foing B., Demetz R., de Vera J.-P. Are postbiotics a reasonable alternative to probiotics for astronaut's health support // *Abstracts 18 Ukrainian conference on Space Research (17-20 вересня, 2018, Київ, Україна)*, с. 65.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике // М.: Мир, 1976.- 436 с.
2. Aguilera L, Toloza L., Giménez R., Odena A., Oliveira E., Aguilar J., Badia J., Baldomà L. Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 // *Proteomics*. - 2014 . - Vol. 14, № 2-3. – P. 222-229.
3. Akao Y., Iio A., Itoh T., Noguchi S., Itoh Y., Ohtsuki Y., Naoe T. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages // *Mol. Ther.* – 2011. - Vol. 19, № 2. P. 395–399.
4. Bello-Morales R., López-Guerrero J.A. Extracellular Vesicles in Herpes Viral Spread and Immune Evasion // *Front Microbiol.* – 2018. - Vol. 25, № 9:2572.
5. Binnenkade L., Teichmann L., Thormann K.M. Iron triggers λ So prophage induction and release of extracellular DNA in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – Vol. 80, № 17. – P. 5304–5316.
6. Cañas M. A., Giménez R., Fábrega M. J., Toloza L., Baldomà L., Badia J. Outer membrane vesicles from the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the commensal ECOR12 enter intestinal epithelial cells via clathrin-dependent endocytosis and elicit differential effects on DNA damage // *PLoS One*. -2016. - 11:e0160374.
7. Chekulayeva L., Shevchuk I., Jaalaid R., Chekulayev V. L-buthionine –[S, R]-sulfoximine may enhance the rate of haematoporphyrin derivative photosensitized inactivation of tumour cells without lowering the intracellular content of glutathione // *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.*, 2000, 49/2, p. 109-120.
8. Danielian L.T. To chemical content and physiological and morphological properties of Kombucha’s cultural liquid // *Transactions of YSZVI*.- 1957.- 22.- P. 111-121.
9. Danielian, L.T. Tea fungus. Publ. House “Armenia”, 1993, 112 pp.
10. Dutta D., Gachhui R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter Kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*- 2007.- 57.- P. 353-357.
11. Evans A.G., Davey H.M., Cookson A., Currinn H., Cooke-Fox G., Stanczyk P.J., Whitworth D.E. Predatory activity of *Myxococcus xanthus* outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo // *Microbiology*. – 2012. -158, Pt 11. – P. 2742-2752.
12. Galaway F.A., Stockley P.G. MS2 viruslike particles: a robust, semisynthetic targeted drug delivery platform // *Mol. Pharm.* – 2013. – 7. - Vol. 10, №1. – P. 59-68.
13. Garner M.M., Revzin A. The use of gel electrophoresis to detect and study nucleic acid-protein interactions // *Trends Biol Sci.* – 1986. - 11. – P. 395 – 396
14. Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // *Biochem J.* – 1954. – 58. – P.345-352.

15. Jang K.S., Sweredoski M.J., Graham R.L., Hess S., Clemons W.M. Jr. Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni* // *J Proteomics*. – 2014. – Vol. 26, №98. - P. 90-98.
16. Kharina A., Podolich O., Faidiuk I., Zaika S., Haidak A., Kukharenko O., Zaets I., Tovkach F., Reva O., Kremenskoj M., Kozyrovska N. Temperate bacteriophages collected by outer membrane vesicles in *Komagataeibacter intermedius* // *J. Basic. Microbiol.* . – 2015. – Vol. 55, №4. – P.509–513.
17. Kozyrovska N., Zaets I., Burlak O., Rogutskyy I., Mytrokhyn O., Mashkovska S., Foing B. The conception of growing the first generation-plants in lunar greenhouses, in: Fedorov, O. P. (Ed), *Space research in Ukraine (2008-2010). The report to the COSPAR.*- 2011. – Academ Periodyka, Kyiv. – P. 105-108.
18. Kozyrovska N., Reva O., Goginyan V., de Vera J.-P. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology// *Biopolym. Cell*. – 2012. – 28. – P.103-113.
19. Kukharenko O., Podolich O., Rybitska A., Reshetnyak G., Burlak O., Ovcharenko L., Voznyuk T., Moshynets O., Rogutskiy I., Zaets I., Yaneva O., Pidgorskiy V., Rabbow E., de Vera J.-P., Kozyrovska N. Robust symbiotic microbial communities in space research, in: Fedorov, O. P. (Ed), *Space research in Ukraine (2010-2011). The report to the COSPAR.* – 2012. – Academ Periodyka, Kyiv. – P.102-105.
20. Manolova V., Flace A., Bauer M., Schwarz K., Saudan P., Bachmann M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size // *Eur J Immunol*. – 2008. - Vol. 38, №5. P. 1404-1413.
21. Mastico R.A., Talbot S.J., Stockley P.G. Multiple presentation of foreign peptides on the surface of an RNA-free spherical bacteriophage capsid // *J Gen Virol*. – 1993. - Vol. 74, Pt 4. P. 541-548.
22. Moelling K. What contemporary viruses tell us about evolution: a personal view // *Arch Virol*. 2013. - Vol.158, № 9. - P. 1833-1848.
23. Nolte-T Hoen E., Cremer T., Gallo R. C., Margolis L. B. Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives? // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2016. – 113. – P. 9155–9161.
24. Ovcharenko, L.P., Reva, O.N., Zaets, I.E., Kukharenko, O., Burlak, O.P., Podolich, O.V., de Vera, J.-P., and Kozyrovska, N.O. DNA metabarcoding of complex microbial communities promising for space research // In *Abstract Book 13th Ukrainian Conference on Space Research (Yevpatoria, September 2–7, 2013)*, Kyiv, Ukraine, p 84.
25. Paul J.H. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? // *ISME J.* - 2008. - 2. – P. 579–589.

26. Podolich O., Zaets I., Kukharenko O., Orlovska I., Reva O., Khirunen L., Sosnin M., Hayidak A., Shpylova S., Rohutsky I., Kharina A., Skoryk M., Kremenskoj M., Klymchuk D., Demets R., de Vera J.-P., Kozyrovska N. The first space-related study of a kombucha multimicrobial cellulose-forming community: preparatory laboratory experiments// *Orig Life Eval Biosph.* – 2017a. – Vol.47, №2. – P.169-185.
27. Podolich O., Zaets I., Kukharenko O., Orlovska I., Reva O., Khirunen L., Sosnin M., Haidak A., Shpylova S., Rabbow E., Skoryk M., Kremenskoj M., Demets R., Kozyrovska N., de Vera J.P. Kombucha Multimicrobial Community under Simulated Spaceflight and Martian Conditions// *Astrobiology.* – 2017b. – Vol.17, №5. – P.459-469.
28. Reva O., Zaets I., Ovcharenko L., Kukharenko O., Shpylova S., Podolich O., Reshetnyak G., de Vera J.-P., Kozyrovska N. Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments // *AMB Express.* – 2015. – 5, №1. – P. 35-43.
29. Tao S.C., Guo S.C., Li M., Ke Q.F., Guo Y.P., Zhang C.Q. Chitosan Wound Dressings Incorporating Exosomes Derived from MicroRNA-126-Overexpressing Synovium Mesenchymal Stem Cells Provide Sustained Release of Exosomes and Heal Full-Thickness Skin Defects in a Diabetic Rat Model // *Stem Cells Transl. Med.* – 2017. - Vol. 6, № 3. - P. 736–747.
30. Tao S.C., Guo S.C., Zhang C.Q. Modularized Extracellular Vesicles: The Dawn of Prospective Personalized and Precision Medicine // *Adv Sci (Weinh).* – 2018. - Vol. 5, № 2:1700449.
31. van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2018. - Vol.19, № 4. – P. 213–228.
32. Wang X., Kim Y.M.Q, Hong S.H., Pokusaeva K., Sturino J.M., Wood T.K. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments // *Nat. Commun.* – 2010. - 1. - P. 147.
33. Xu N., Wang L., Guan J., Tang C., He N., Zhang W., Fu S. Wound healing effects of a *Curcuma zedoaria* polysaccharide with platelet-rich plasma exosomes assembled on chitosan/silk hydrogel sponge in a diabetic rat model // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – 117. - P.102–107.
34. Zakhazhevskaya N.B., Vanyushkina A.A., Altukhov I.A., Shavarda A.L., Butenko I.O., Rakitina D.V., Nikitina A.S., Manolov A.I., Egorova A.N., Kulikov E.E., Vishnyakov I.E., Fisunov G.Y., Govorun V.M. Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic *Bacteroides fragilis* represent different metabolic activities // *Sci Rep.* – 2017. - Vol. 7, № 1:5008.
35. Zaets I., Podolich O., Kukharenko O., et al. Bacterial cellulose may provide the microbial-life biosignature in the rock records // *Adv. Space Res.* - 2014. - Vol. 53, №5. - P.828–835.
36. Zaets I. Ye., Podolich O. V., Reva O. N., Kozyrovska N. O. DNA metabarcoding of microbial communities for healthcare // *Biopolym. Cell.* – 2016. - Vol. 32, № 1. - P. 3-8.
37. Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: a review // *Mol Biotechnol.* - 2013. – Vol. 53, № 1. - P. 92-107.