

ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

БЕЗМАТЕРНЫХ Ксения Викторовна

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА
ИНДУКЦИЮ СТРЕССОВЫХ РЕГУЛОНОВ И ТОЛЕРАНТНОСТЬ К
АНТИБИОТИКАМ У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Г.В. Смирнова

Пермь – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	15
ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И МЕТАБОЛИЗМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	15
1.1. Полифенолы.....	15
1.1.1. Общая характеристика полифенолов.....	15
1.1.2. Классификация полифенолов	17
1.2. Фитостероиды.....	19
1.2.1. Общая характеристика фитостероидов.....	19
1.2.2. Классификация стероидов.....	21
1.3. Антиоксидантные и прооксидантные свойства полифенолов и стероидов.....	23
1.3.1. Механизмы антиоксидантной активности полифенолов и стероидов	23
1.3.1.1. Радикал-связывающая активность (РСА)	24
1.3.1.2. Металл-хелатирующая способность полифенолов и стероидов	25
1.3.1.3. Взаимодействие полифенолов и стероидов с клеточными мембранами	26
1.3.1.4. Действие полифенолов и стероидов на антиоксидантные системы клетки.....	27
1.3.2. Прооксидантные и токсические свойства полифенолов и стероидов	28
1.3.3. Методы оценки антиоксидантной активности полифенолов и стероидов	29
1.4. Биодоступность и влияние полифенолов и стероидов на живые организмы	31
1.4.1. Биодоступность полифенолов	31
1.4.2. Биодоступность фитостероидов	32
1.4.3. Терапевтические эффекты полифенолов и стероидов	33
1.4.4. Влияние полифенолов и стероидов на жизнедеятельность бактерий	34
ГЛАВА 2. СТРЕССОВЫЕ РЕГУЛОНЫ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	37
2.1. Адаптация <i>E. coli</i> к окислительному стрессу.....	37

2.1.1. Активные формы кислорода.....	37
2.1.2. Повреждения, вызываемые АФК	39
2.1.3. Механизмы защиты от окислительного стресса.....	40
2.1.4. Адаптивный ответ на окислительный стресс.....	42
2.2. Общий стрессовый ответ.....	44
2.3. SOS-ответ	46
ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ	49
3.1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки	50
3.2. Ингибиторы синтеза белка.....	50
3.3. Ингибиторы репликации и транскрипции.....	52
3.4. Оксидантный механизм бактерицидного действия антибиотиков и программируемая клеточная смерть	53
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	58
ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	58
4.1. Объекты исследования	58
4.2. Питательные среды и условия культивирования	58
4.3. Определение удельной скорости роста.....	59
4.4. Определение влияния экстрактов на чувствительность <i>E. coli</i> к H_2O_2 и антибиотикам.....	59
4.5. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антибиотиков	60
4.6. Колониеобразующая способность.....	60
4.7. Определение активности β -галактозидазы.....	61
4.8. Получение экстрактов растений.....	62
4.9. Общее содержание полифенолов в экстрактах.....	62
4.10.Содержание отдельных полифенолов и экистероидов в экстрактах.....	63
4.11.Определение хелатирующей активности	63
4.12.Определение радикалсвязывающей активности (РСА)	64
4.13.Измерение скорости продукции H_2O_2 препаратами.....	64
4.14.Измерение парциального давления кислорода	65
4.15.Измерение ионов K^+	65
4.16.Выявление изменений мембранного потенциала	65
4.17.Статистическая обработка результатов	66
4.18.Материалы	66
ГЛАВА 5. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИФЕНОЛЫ И ЭКДИСТЕРОИДЫ, И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ СТРЕССОВЫХ РЕГУЛОНОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	67
5.1. Изучение свойств исследуемых препаратов с использованием химических тестов	68

5.1.1. Содержание полифенолов и экдистероидов в исследуемых препаратах.....	68
5.1.2. Изучение радикал-связывающей, хелатирующей и прооксидантной активности исследуемых препаратов	71
5.2. Изучение влияния исследуемых препаратов на растущие культуры бактерий <i>E. coli</i>	74
5.2.1. Влияние исследуемых препаратов на удельную скорость роста.....	74
5.2.2. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию стрессовых регулонов	78
5.2.3. Антиоксидантное действие исследуемых препаратов на клетки <i>E. coli</i> при пероксидном стрессе	85
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИФЕНОЛЫ И ЭКДИСТЕРОИДЫ, НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ <i>E. COLI</i> К РАЗЛИЧНЫМ АНТИБИОТИКАМ	88
6.1. Изучение влияния исследуемых препаратов на чувствительность <i>E. coli</i> к действию антибиотиков разных классов	88
6.1.1. Изучение влияния исследуемых препаратов на чувствительность <i>E. coli</i> к ципрофлоксацину	88
6.1.2. Изучение влияния исследуемых препаратов на чувствительность <i>E. coli</i> к канамицину	94
6.1.3. Изучение влияния исследуемых препаратов на чувствительность <i>E. coli</i> к стрептомицину	99
6.1.4. Влияние исследуемых препаратов на чувствительность <i>E. coli</i> к цефотаксиму	103
6.2. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию стрессовых регулонов при действии ципрофлоксацина	107
ОБСУЖДЕНИЕ	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
ВЫВОДЫ	133
ЛИТЕРАТУРА	135

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

20E	20-гидроксиэкдизон
АОА	антиоксидантная активность
АТФ	аденозин-5'-трифосфат
АФК	активные формы кислорода
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	колониеобразующая единица
МИК	минимальная ингибирующая концентрация
ОНФГ	<i>o</i> -нитрофенил- β -D-галактопиранозид
ПСБ	пенициллинсвязывающий белок
ПФ	полифенолы
РНК	рибонуклеиновая кислота
РСА	радикалсвязывающая активность
ХС	хелатирующая способность
DiBAC ₄ (3)	бис-(1.3-дибутилбарбитуратовая кислота)-триметиноксонол (bis-(1.3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol)
DPPH	2.2-дифенил-1-пикрилгидразил
GSH	глутатион восстановленный
GSSG	глутатион окисленный
HPI	каталаза гидропероксидаза I
HPH	гидропероксидаза II
NAD ⁺	никотинамидадениндинуклеотид окисленный
NADH	никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
NADP	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
OD ₆₀₀	оптическая плотность при длине волны 600 нм
OxyR	транскрипционный фактор, активируемый пероксидом водорода
pO ₂	парциальное давление кислорода
(p)ppGpp	гуанозин(пента-)тетрафосфат
RpoS (σ^S)	альтернативная сигма-субъединица РНК-полимеразы
SOD	супероксиддисмутаза
SoxRS	сенсорный и регуляторный белки ответа на супероксидный стресс
SOS-ответ	система, включающаяся в клетке в ответ на повреждения ДНК
$\Delta\psi$	мембранный потенциал

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Большинство живых организмов используют дыхание как основной способ получения энергии. Однако неизбежными побочными продуктами аэробного метаболизма являются активные формы кислорода (АФК), которые проявляют токсическое действие в отношении любых типов клеток, клеточных структур и биомолекул, включая ДНК, РНК, белки и липиды (Imlay, 2008). Живые организмы, в том числе бактерии, выработали различные защитные и репаративные механизмы, которые позволяют сохранять концентрацию свободных радикалов на низком уровне и восстанавливать повреждения, возникающие при окислительном стрессе (Sies, 1997). В то же время, АФК используются клетками как регуляторные сигналы, вызывающие повышение или понижение экспрессии множества генов и переключение метаболических путей. Многие болезни человека, такие как рак, диабет, нервно-дегенеративные заболевания и процесс старения организма сопряжены с нарушением баланса между реакциями окисления и восстановления в сторону усиления продукции АФК. Фармацевтический рынок предлагает большой выбор различных биодобавок, обладающих антиоксидантными свойствами, которые широко используются для профилактики старения и комплексной терапии различных заболеваний. Многие из этих добавок содержат лекарственные растения и их компоненты, в том числе полифенолы и фитоэкдистероиды.

Масштабные эпидемиологические исследования, проводимые с начала 1990-х годов, показали, что диета, богатая полифенолами, оказывает положительное влияние на здоровье человека (Crozier, 2009). Полифенолы и экдистероиды обладают защитным, корректирующим и тонизирующим эффектом, проявляя антиканцерогенные, гепатопротекторные, иммунопротекторные и противодиабетические свойства и выступая как адаптогены (Lafont, Dinan, 2003; Han *et al.*, 2007; Báthori *et al.*, 2008; Fraga *et al.*, 2010). Считается, что в основе положительного влияния этих соединений на здоровье лежит их антиоксидантная активность (АОА), в частности

способность к связыванию радикалов и редокс-активных металлов, а также их модулирующее действие на редокс-статус клеток и активность стрессовых регулонов (López-Alarcón, Denicola, 2013). В то же время в аэробных условиях полифенолы могут подвергаться аутоокислению с образованием АФК, то есть выступать в качестве прооксидантов и производить цитотоксический и мутагенный эффект (Maksimov *et al.*, 2003; Tang, Halliwell, 2010). Следует отметить, однако, что при прохождении по желудочно-кишечному тракту значительная часть полифенолов не всасывается в кровь или подвергается превращению в различные производные. В итоге концентрация редокс-активных полифенолов в плазме не превышает наномолярного уровня, что делает маловероятным их непосредственное участие в прямом антиоксидантном действии на клетки человека и животных (Tang, Halliwell, 2010). В отличие от клеток млекопитающих, микробиота кишечника, которая в последние годы рассматривается как важный метаболический орган (Dueñas *et al.*, 2015; Espín *et al.*, 2017), может прямо контактировать с достаточно высокими концентрациями немодифицированных полифенолов и экдистероидов и выступать как вероятный посредник их положительного влияния на здоровье. Исследования, посвященные воздействию полифенолов на микроорганизмы, связаны в основном с изучением их бактерицидного и мутагенного действия (Cushnie, Lamb, 2005; Тараховский и др., 2013). Данные о влиянии экдистероидов на бактерии крайне ограничены. Известно только, что они не оказывают отрицательного воздействия на ассоциации микроорганизмов, обитающих в кишечнике (Šelepcová *et al.*, 1993; Тимофеев, 2006). Работы сотрудников лаборатории физиологии и генетики ИЭГМ показали, что некоторые флавоноиды и танины, ряд экстрактов лекарственных растений, зеленый и черный чай способны активировать экспрессию антиоксидантных регулонов и влиять на устойчивость бактерий *E. coli* к окислительному стрессу (Oktyabrsky *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2009, 2010, 2012; Samoilova *et al.*, 2014). Однако в целом характер воздействия

полифенолов и экдистероидов на стрессовые регулоны и механизм их антиоксидантного действия остается недостаточно изученным.

Актуальность исследования эффектов биологически активных соединений на микробиоту кишечника возрастает в связи с вероятностью их модулирующего влияния на чувствительность бактерий к антибиотикам. В последнее десятилетие предложена гипотеза, согласно которой окислительный стресс является единым механизмом гибели клеток при действии различных антибиотиков (Kohanski *et al.*, 2007; Belenky *et al.*, 2015). Показано, что хелатор железа дипиридил, а также антиоксиданты тиомочевина, аскорбиновая кислота и глутатион повышают устойчивость бактерий к действию ряда антибиотиков, а делеции антиоксидантных генов *katG*, *katE*, *sodC* и *ahpC* увеличивают чувствительность к фторхинолонам, аминогликозидам и β -лактамам (Goswami *et al.*, 2006, 2007; Kohanski *et al.*, 2007; Wang, Zhao, 2009; Dwyer *et al.*, 2014). Несмотря на интенсивную критику гипотезы (Ezraty *et al.*, 2013; Keren *et al.*, 2013; Liu, Imlay, 2013), она продолжает вызывать большой интерес в связи с потенциальной возможностью усиления бактерицидной активности антибиотиков путем воздействий, повышающих уровень АФК. Поскольку полифенолы и экдистероиды могут проявлять антиоксидантные и прооксидантные свойства, выяснение характера их взаимодействия с антибиотиками приобретает большую актуальность. В целом, независимо от мишени и механизма их воздействия изучение влияния полифенолов и экдистероидов в составе продуктов и пищевых добавок на толерантность бактерий к антибиотикам представляет большой теоретический и практический интерес, поскольку может существенно влиять на эффективность антибиотикотерапии.

Цель настоящего исследования – изучить влияние биологически активных соединений на индукцию стрессовых регулонов и толерантность к антибиотикам у бактерий *Escherichia coli*.

Объекты исследования – бактерии *Escherichia coli* и две группы биологически активных субстанций. Первая группа включает соединения

полифенольной природы (кверцетин, ресвератрол, биодобавка «Трансверол», красное виноградное вино и экстракт кожицы красного винограда), вторая группа представлена экистероидсодержащими препаратами (20-гидроксиэкдизон, биодобавка «Серпистен», экстракты серпухи венценосной и пажитника сенного).

Основные задачи исследования:

1. Определить качественное и количественное содержание полифенолов и экистероидов в составе изучаемых субстанций. Провести комплексную оценку их радикалсвязывающей, хелатирующей и прооксидантной активности.
2. Провести сравнительное исследование влияния полифенол- и экистероидсодержащих субстанций на рост и колониеобразующую способность *E. coli* в норме, в условиях индуцированного окислительного стресса (2мМ H_2O_2) и при действии антибиотиков различной природы (фторхинолон ципрофлоксацин, β -лактам цефотаксим и аминогликозиды канамицин и стрептомицин).
3. Изучить влияние биологически активных субстанций на экспрессию генов, принадлежащих к стрессовым регулонам *E. coli*, в нормальных условиях и при действии ципрофлоксацина.

Научная новизна. Впервые с использованием химических тестов и бактерий *E. coli* в качестве биологической тест-системы проведено комплексное изучение антиоксидантной активности исследуемых субстанций. Установлено, что наибольший протекторный эффект в условиях окислительного стресса (высокое значение индекса АОА, который определяется как отношение скорости роста бактерий, предобработанных субстанциями, к скорости роста необработанных клеток при добавлении H_2O_2) производят субстанции, содержащие полифенолы с высокой хелатирующей активностью и способностью к аутоокислению с образованием АФК. Тролокс, ресвератрол и 20-гидроксиэкдизон (20Е), которые обладали высокой антирадикальной активностью, но демонстрировали низкую хелатирующую и

прооксидантную способность в химическом тесте, не проявляли антиоксидантных свойств в микробной тест-системе.

Впервые изучено влияние исследуемых субстанций на экспрессию четырех различных стрессовых регулонов *E. coli*, включая OxyR (ген *katG*), SoxRS (ген *sodA*), RpoS (гены *rpoS* и *katE*) и SOS-регулон (ген *sulA*). Показано, что экспрессия антиоксидантных генов *katG* и *sodA*, кодирующих каталазу-гидропероксидазу HPI и Mn-супероксиддисмутазу, тесно коррелирует с содержанием полифенолов в экстрактах ($r = 0.98$) и их прооксидантной активностью. Индукция генов *katG* и *sodA*, наряду с высокой хелатирующей способностью, была обязательным условием протекторного действия субстанций на бактерии при окислительном стрессе, вызванным H_2O_2 . Впервые обнаружена способность препаратов, содержащих экдистероиды, вызывать SOS-ответ в клетках *E. coli*. Наибольшее индуцирующее воздействие проявлял серпистен, который стимулировал экспрессию *sulA::lacZ* в 3.2 раза по сравнению с контролем.

Впервые показано, что практически все изученные субстанции обладают способностью модифицировать толерантность бактерий к антибиотикам. Степень и направленность эффекта зависела как от природы и концентрации самого препарата, так и от типа антибиотика, его концентрации и времени экспозиции. Предобработка высокими дозами кверцетина (40 мкг/мл) и ресвератрола (100 мкг/мл), трансверолом и дипиридилом повышала МИК и выживаемость *E. coli* при экспозиции ко всем исследованным антибиотикам. Вино, экстракты виноградной кожицы, серпухи и пажитника защищали бактериальные клетки от летального действия ципрофлоксацина и цефотаксима. В отличие от высоких концентраций, обладавших протекторным действием, низкие дозы кверцетина и ресвератрола усиливали эффект канамицина и ципрофлоксацина. Экстракты виноградной кожицы, серпухи, пажитника и серпистен также стимулировали бактерицидную активность канамицина и стрептомицина. 20Е не изменял чувствительность к цефотаксиму, усиливал эффект низкой дозы ципрофлоксацина и повышал

толерантность к канамицину, стрептомицину и высоким дозам ципрофлоксацина. Сложный характер влияния субстанций на действие антибиотиков, по-видимому, опосредуется совокупностью специфических и неспецифических механизмов, среди которых ведущую роль играет их влияние на скорость роста и индукцию защитных систем бактерий.

Впервые установлена способность исследованных субстанций модифицировать SOS-ответ, индуцированный ципрофлоксацином. 20E и низкие дозы кверцетина и ресвератрола стимулировали экспрессию гена *sulA*, что сопровождалось усилением бактерицидной активности антибиотика. Высокие концентрации кверцетина и ресвератрола, напротив, снижали индукцию SOS-ответа и уменьшали чувствительность к антибиотику, что может указывать на конкурентный характер взаимодействия между полифенолами и ципрофлоксацином за сайт связывания на ДНК-гиразе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют представления о молекулярных механизмах действия биологически активных соединений растительного происхождения на бактерии *E. coli* и имеют фундаментальный характер. Данные о модифицирующем влиянии полифенол- и экистероидсодержащих субстанций на толерантность бактерий к окислительному стрессу и антибиотикам представляют большой теоретический и практический интерес, поскольку открывают возможности для более рационального применения антимикробных препаратов. Выявлены конкретные субстанции, способные снижать или усиливать бактерицидную активность антибиотиков, принадлежащих к разным классам. К числу таких субстанций относятся фармацевтические препараты «Трансверол» и «Серпистен», используемые как кардиопротекторы и адаптогены. При совместном применении антибиотиков с этими препаратами и продуктами, богатыми полифенолами, необходимо учитывать возможность их влияния на эффективность антибиотикотерапии. Полученные результаты полностью соответствует основному направлению раздела НЗ Стратегии НТР РФ: «Переход к персонализированной медицине,

высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)».

Методология и методы исследования. При выполнении исследований использовались бактерии родительского штамма *Escherichia coli* BW25113 (Coli Genetic Stock Center) и созданные на его основе штаммы, несущие слияния промоторов генов *katG*, *katE*, *sodA*, *rpoS(katF)* и *sulA(sfiA)* со структурным геном *lacZ*, кодирующим β -галактозидазу. Штаммы были сконструированы в Лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов методами трансформации плазмид или трансдукции с фагом PI. Экспрессию генов изучали, определяя активность β -галактозидазы в штаммах, несущих слияния с геном *lacZ*. За ростом бактерий следили путем измерения оптической плотности в 96-луночных полистирольных планшетах с использованием микропланшетного спектрофотометра xMark Bio-Rad. Минимальную ингибирующую концентрацию антибиотиков измеряли в планшетах методом серийных разведений. Колониеобразующую способность бактерий определяли методом высева на твердый агар. Общее содержание полифенолов измеряли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Folin-Ciocalteu. Содержание отдельных полифенолов и экистероидов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Перекись водорода измеряли чувствительным спектрофлуориметрическим методом с красителем Amplex Red и пероксидазой хрена (AR/HRP). Антирадикальную активность препаратов определяли по способности препаратов связывать стабильные радикалы 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH[•]). Хелатирующую способность препаратов оценивали методом, основанным на их способности ингибировать реакцию образования комплекса феррозин-Fe²⁺. Измерение pO₂ определяли полярографическим методом с использованием электрода Кларка и комплекта измерительной аппаратуры. Мембранный потенциал определяли с помощью проникающего флуоресцентного красителя DiBAC4(3). Уровень

экстраклеточного K^+ непрерывно регистрировали непосредственно в колбах с использованием системы K^+ -селективных и эталонных электродов и компьютерного рН-метра/иономера.

Положения, выносимые на защиту:

1. Исследуемые полифенол- и экдистероидсодержащие субстанции проявляют различную антирадикальную, хелатирующую и прооксидантную активность в зависимости от их качественного и количественного состава.
2. Исследуемые субстанции влияют на скорость роста бактерий и изменяют уровень экспрессии генов, принадлежащих к различным стрессовым регулонам.
3. Антиоксидантная активность на уровне бактериальной клетки определяется хелатирующей способностью исследуемых препаратов и их воздействием на степень индукции антиоксидантных генов *katG* и *sodA*.
4. Предварительная обработка полифенол- и экдистероидсодержащими субстанциями существенно модулирует толерантность бактерий к антибиотикам. Степень и направление изменений зависят от вида и концентрации препарата и антибиотика.
5. Исследуемые препараты изменяют степень индукции SOS-ответа, вызванного действием ципрофлоксацина.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на Международной научной конференции «ЭкоБиотех-2013», Уфа, 2013; II Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии», Пермь, 2015; IX Международной конференции «Биоантиоксидант», Москва, 2015; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Наукоемкие биомедицинские технологии», Пермь, 2016; Научной конференции «История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований», Пермь, 2017; Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни», Пермь, 2018.

По теме диссертации опубликовано 26 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ (1 статья в иностранном рецензируемом журнале).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 165 страницах печатного текста, иллюстрирована 51 рисунком и 7 таблицами; состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, двух глав собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Список литературы содержит 318 источников, из них 16 отечественных и 302 зарубежных автора.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Работа выполнена в Лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» филиала Пермского федерального исследовательского центра в соответствии с планом НИР Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН и соответствует направлению исследований по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» (номер госрегистрации 01201353249). Исследования поддержаны грантом по интеграционному проекту № 12-И-4-2072 «Ресурсный и биотехнологический потенциал растений Урала и сопредельной территории европейского северо-востока России – продуцентов важнейших групп биологически активных веществ», грантом РФФИ-Урал № 14-04-96031 «Влияние экстрактов лекарственных растений на устойчивость бактерий к антибиотикам в биофильмах», грантом РФФИ № 16-04-00762 «Изучение взаимосвязи между скоростью роста, редокс-статусом и устойчивостью к стрессам у бактерий *Escherichia coli*», грантом Президента РФ МК-3376.2018.4 «Исследование действия биологически активных веществ растительного происхождения на молекулярно-генетические механизмы регуляции биопленкообразования у кишечных бактерий».

Научные положения и выводы диссертационной работы базируются на результатах собственных исследований автора.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И МЕТАБОЛИЗМ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИРОДНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Растения являются продуцентами более 100000 биологически активных соединений (полифенолы, экистероиды, каротиноиды, алкалоиды, витамины, хиноны и другие), способных оказывать влияние на различные процессы в организме человека и животных. Многие из этих соединений широко используются в фармакологической, косметической и пищевой промышленности для получения лекарственных препаратов, биодобавок и косметических средств. Для глубокого понимания влияния этих препаратов на здоровье необходимо исследование механизмов их действия на различные системы организма, включая микробиоту кишечника, которая рассматривается как важный метаболический орган, влияющий на состояние всего организма.

1.1. Полифенолы

1.1.1. Общая характеристика полифенолов

Полифенольные соединения, в том числе флавоноиды и танины, относящиеся к вторичным продуктам метаболизма растений, участвуют во многих ключевых процессах роста и развития, позволяя растениям адаптироваться к меняющейся среде обитания. Содержание отдельных полифенолов в растениях определяет их окраску, аромат цветов, вкус овощей и плодов (Тараховский и др., 2013). Разнообразие флавоноидов природного происхождения огромно и составляет около восьми тысяч соединений, широко представленных по всему растительному царству (Crozier *et al.*, 2009). В клетках животных и человека флавоноиды не синтезируются, и их присутствие в тканях полностью зависит от потребляемых в пищу растительных продуктов. Фрукты, овощи, цельное зерно и другие продукты, а

также напитки, такие как чай, кофе, какао, шоколад, виноградный сок и вино являются богатыми источниками фенольных соединений (Tsao, 2010).

Масштабные эпидемиологические исследования, проводимые с начала 1990-х годов, показали, что диета, богатая полифенолами, оказывает положительное влияние на здоровье человека (Crozier *et al.*, 2009). В культуре клеток флавоноиды защищают от цитотоксичности, повреждения ДНК и апоптоза, индуцированного различными оксидантами (Melidou *et al.*, 2005). Антиоксидантные свойства полифенолов объясняются их способностью нейтрализовать свободные радикалы и хелатировать редокс-активные железо и медь, участвующие в реакции Фентона (Silva *et al.*, 2002; Костюк, Потапович, 2004; Melidou *et al.*, 2005; Perron, Brumaghim, 2009; Тараховский и др., 2013). В то же время в аэробных условиях полифенолы могут подвергаться аутоокислению с образованием активных форм кислорода, то есть выступать в качестве прооксидантов и проявлять цитотоксический и мутагенный эффект (Maksimov *et al.*, 2003; Halliwell, 2008; Fraga *et al.*, 2009; Tang, Halliwell, 2010). Антиоксидантные и прооксидантные свойства полифенолов позволяют им модулировать редокс-состояние тиолов в ферментах и регуляторных белках, взаимодействовать с путями передачи внутриклеточных сигналов и индуцировать экспрессию антиоксидантных и стрессовых генов (Eberhardt, Jeffery, 2006; Parisi *et al.*, 2013). Следует отметить, однако, что при прохождении по желудочно-кишечному тракту значительная часть полифенолов не всасывается в кровь или подвергается превращению в различные дериваты. В итоге концентрация редокс-активных полифенолов в плазме не превышает наномолярного уровня, что делает маловероятным их непосредственное участие в прямом антиоксидантном действии на клетки человека и животных (Tang, Halliwell, 2010). В отличие от клеток млекопитающих, микробиота кишечника может прямо контактировать с немодифицированными полифенолами в достаточно высоких концентрациях. Показано, что полифенолы способны оказывать бактериостатическое, бактерицидное и мутагенное действие на различные бактерии (Maksimov *et al.*,

2003; Cushnie, Lamb, 2005), а также модулировать устойчивость к окислительному стрессу и антибиотикам у бактерий *E. coli* путем активации стрессовых регулонов (Oktyabrsky *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2009, 2010, 2012; Samoilova *et al.*, 2014).

По химической структуре полифенолы характеризуются наличием, по меньшей мере, одного ароматического кольца, содержащего одну или несколько гидроксильных групп. Большинство полифенолов в растениях существуют в виде гликозидов, содержащих сахара в различных положениях фенольного скелета, или в виде агликонов (Tsao, 2010).

1.1.2. Классификация полифенолов

Классификация полифенолов основана на анализе структуры фенольной части молекулы, однако их разнообразие в значительной степени определяется молекулами углеводов, органических кислот и других соединений, присоединенных к ароматическому каркасу (Niem *et al.*, 2002; Тараховский и др., 2013). Полифенолы можно разделить на две основные группы: флавоноиды и не-флавоноиды (Crozier *et al.*, 2009).

Флавоноиды (более 6000 видов) содержат 15 атомов углерода с двумя ароматическими кольцами, соединенными с помощью 3-углеродного мостика. Обычно общую формулу флавоноидов представляют следующим образом: $C_6-C_3-C_6$ (Рисунок 1) (Mocanu *et al.*, 2015).

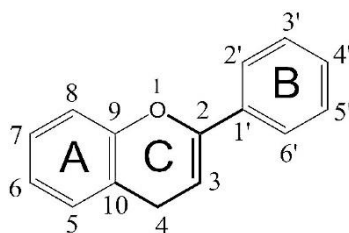
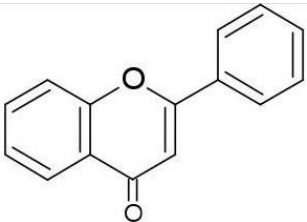
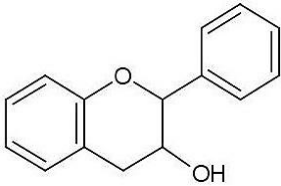
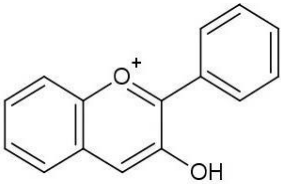
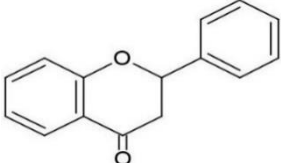
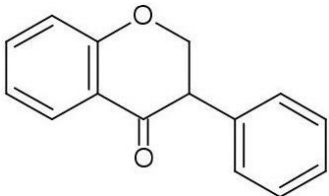


Рисунок 1. Общая структура молекулы флавоноидов (Mocanu *et al.*, 2015).

Флавоноиды могут быть разделены на подклассы в соответствии с различиями в структуре трех углеродных атомов (C_2 , C_3 , C_4) центрального C-кольца (Таблица 1). Особенностью этой группы атомов является возможность присутствия двойной связи, присоединение карбонильной или гидроксильной

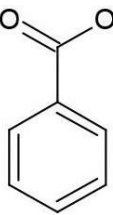
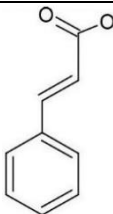
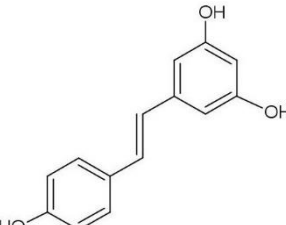
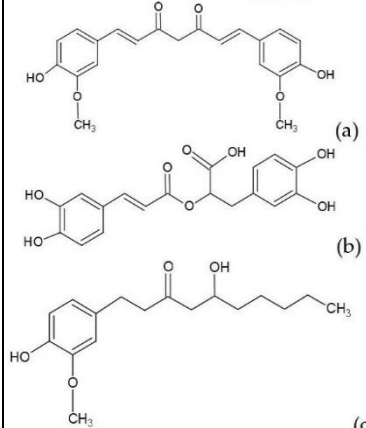
групп, а также способность образовывать пяти- или шестичленные гетероциклические кольца, которые могут присоединяться не только к концевым атомам углеродной цепи C_3 (Fraga *et al.*, 2009; Мосану *et al.*, 2015).

Таблица 1. Основные подклассы флавоноидов (Мосану *et al.*, 2015).

Подклассы флавоноидов	Химическая структура	Представители	Источники
Флавонолы		Кверцетин Кемпферол Мирицетин	Лук, шпинат, цветная капуста, земляника
Флавоны		Апигенин Лютеолин	Сельдерей, петрушка, артишок
Флаван-3-олы, проантоцианиды		Эпикатехин, Эпигаллокатехин, Эпигаллокатехин галлат, Процианидин	Абрикос, вишня, виноград, ежевика, яблоко, темный шоколад, зеленый чай, фисташки
Антоцианидины		Цианидин, Пеларгонидин, Дельфинидин, Мальвидин	Красный виноград, черная смородина, вишня, клюква, слива, персик, черника, бузина
Флаваноны		Нарингенин, Гесперетин	Апельсин, лимон, мандарин, грейпфрут, томат
Изофлавоны		Генистеин, Даидзеин, Глицитеин	Соя, бобы, зеленый горошек

Основным представителем класса не-флавоноидов (Таблица 2) являются C_6-C_1 фенольные кислоты, в первую очередь галловая кислота, которая является предшественником гидролизуемых танинов, C_6-C_3 гидроксикоричные кислоты и их производные, а также $C_6-C_2-C_6$ стильбены.

Таблица 2. Основные подклассы не-флавоноидов (Mocanu *et al.*, 2015).

Подклассы не-флавоноидов	Химическая структура	Представители	Источники
Фенольные кислоты – бензойные кислоты C ₆ -C ₁		Галловая кислота p-гидроксibenзойная кислота Ванильная кислота Сиреневая кислота	Бутоны гвоздичного дерева, зерно: пшеница, рис, овес, рожь, ячмень
Фенольные кислоты – коричные кислоты C ₆ -C ₃		p-кумаровая кислота кофейная кислота феруловая кислота хлорогеновая кислота	Яблоки, финики, необжаренные кофейные зерна, морковь
Стильбены C ₆ -C ₂ -C ₆		Ресвератрол	Красное вино, арахис, краснокочанная капуста, шпинат
Другие полифенолы	 (a) (b) (c)	Куркумин (a) Розмариновая кислота (b) Гингерол (c)	Куркума, розмарин, имбирь

Многие фенольные соединения полимеризуются в крупные молекулы – танины, среди которых выделяют подклассы гидролизуемых, конденсированных (проантоцианидины) и сложных танинов (Haslam, 2007).

1.2. Фитоэкдистероиды

1.2.1. Общая характеристика фитоэкдистероидов

Экдистероиды представляют собой стероидные гормоны членистоногих, которые контролируют линьку и метаморфоз. Обнаруженные в растениях аналоги экдистероидов называют фитоэкдистероидами. Многочисленные исследования позволили изолировать более 400 различных

фитоэкдистероидов, которые широко распространены в растительном царстве, однако различия в их содержании могут достигать 8-9 порядков. Обычное количество экдистероидов в растениях составляет менее 0.00001%, примерно у 4-5% из них – от 0.01 до 0.001%, и лишь у нескольких видов концентрация может достигать 0.5-1.5% в расчете на сухую массу. Большинство видов растений, употребляемых в пищу, не содержат фитоэкдистероидов, за исключением шпината (*Spinacia oleracea*) и киноа (*Chenopodium quinoa*), в семенах и молодых листьях которых достигаются значительные уровни экдистероидов. Роль экдистероидов в растениях остается недостаточно изученной. Предполагается, что они выполняют экологическую функцию, защищая растение от фитофагов (Dinan, 2001; Тимофеев, 2006).

В организме человека и млекопитающих фитоэкдистероиды не синтезируются и попадают в него с растительной пищей. Показано, что экдистероиды непосредственно не взаимодействуют с рецепторами стероидных гормонов млекопитающих, однако могут оказывать положительное влияние на здоровье (Kholodova, 2001; Cai *et al.*, 2002; Báthori *et al.*, 2008; Mamadalieva *et al.*, 2011; Si *et al.*, 2014). Механизм воздействия экдистероидов на клетки млекопитающих изучен в недостаточной степени. Также как в случае полифенолов, показана их способность к связыванию радикалов и хелатированию редокс-активных железа и меди (Nsimba *et al.*, 2008). Очищенные фитоэкдистероиды, преимущественно 20-гидроксиэкдизон (20E), из растений семейств *Silene*, *Leuzea*, *Serratula*, *Cyanotis* используются для производства биологически активных добавок, которые применяются в сельском хозяйстве, косметической промышленности, спортивной медицине, а также при комплексной терапии ряда заболеваний (Dinan, Lafont, 2006; Lafont, Dinan, 2009).

Фитоэкдистероиды относятся к классу стероидов с полигидроксилированным стерановым кольцом. Первым из

идентифицированных и наиболее часто встречающихся экидистероидов является 20-гидроксиэкидизон (Рисунок 2).

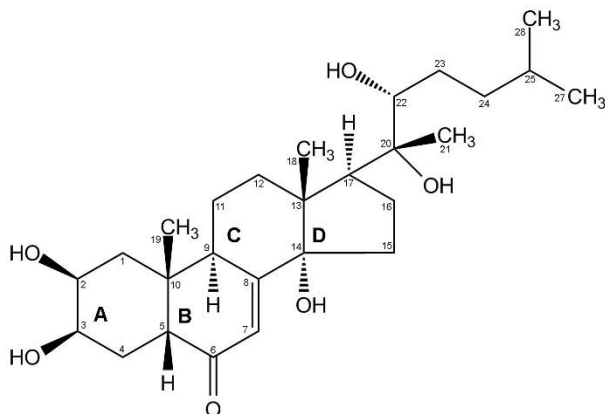


Рисунок 2. Строение молекулы 20-гидроксиэкидизона (Dinan, Lafont, 2006).

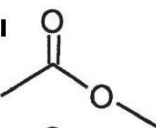
1.2.2. Классификация экидистероидов

Экидистероиды различаются по числу атомов углерода (C_{24} - C_{29}), а также по количеству и расположению гидроксильных и кето-групп. Они могут быть в свободной или конъюгированной (гликозидной или сложноэфирной) форме, содержащей полярный или неполярный остаток (Рисунок 3) (Dinan *et al.*, 2009).

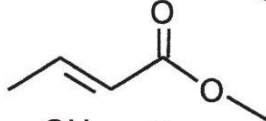
НЕПОЛЯРНЫЕ

сложные эфиры

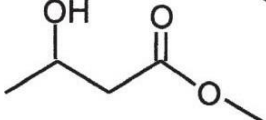
Ацетат (2, 3, 22, 25)



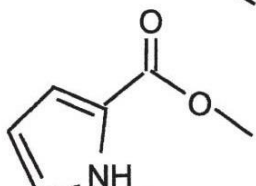
Кротонат (3)



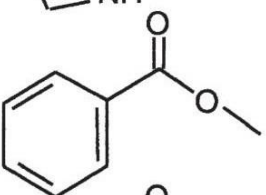
3-гидроксипутират (22)



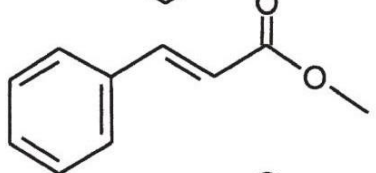
Пиррол-2-карбоксилат (24)



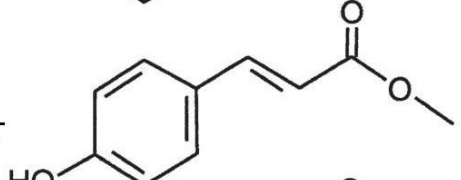
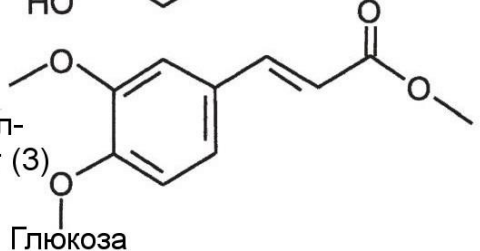
Бензоат (20, 22, 25)



Циннамат (2)



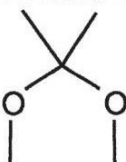
p-кумарат (3)

Гликозил-
ферулат (3)

Глюкоза

простые эфиры

Ацетонид (2, 3 и/или 20, 22)



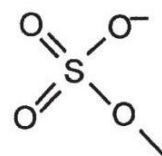
Метилловый эфир (25)



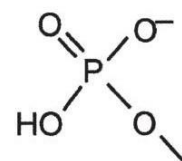
ПОЛЯРНЫЕ

заряженные

Сульфат (22)

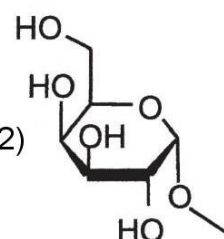


Фосфат (3)

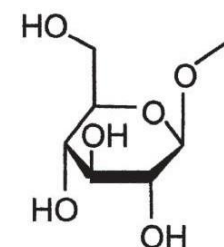


незаряженные

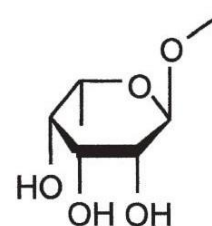
α-галактозид (3, 22)



β-гликозид (2, 3, 22, 24, 25)



β-рамнозид (25)



β-ксилозид (3)

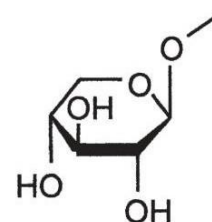


Рисунок 3. Радикалы, которые могут заменять атомы С в положениях, указанных в скобках (Dinan *et al.*, 2009).

1.3. Антиоксидантные и прооксидантные свойства полифенолов и экдистероидов

1.3.1. Механизмы антиоксидантной активности полифенолов и фитоэкдистероидов

Антиоксидантные свойства полифенольных соединений и фитоэкдистероидов основаны на их способности связывать свободные радикалы и хелатировать ионы металлов с переменной валентностью (Тараховский и др., 2013). Однако антиоксидантное действие на живую клетку не ограничивается нейтрализацией АФК и предотвращением реакций типа Фентона, продуцирующих токсичный гидроксильный радикал, а включает также регуляцию антиоксидантных и детоксифицирующих ферментов, модуляцию передачи редокс-сигналов и экспрессии антиоксидантных генов (Eberhardt, Jeffery, 2006). В соответствии с таким подходом в настоящее время предложено новое определение антиоксиданта как вещества или смеси соединений, способных модулировать редокс-статус клетки (López-Alarcón, Denicola, 2013). Перечень механизмов антиоксидантной активности полифенолов, предложенных Procházková и др. (2011), включает:

- ✧ прямое связывание АФК;
- ✧ хелатирование металлов с переменной валентностью;
- ✧ активацию антиоксидантных ферментов;
- ✧ защиту липопротеинов путем снижения количества радикалов α -токоферола;
- ✧ ингибирование оксидаз, катализирующих продукцию супероксида;
- ✧ снижение окислительного стресса, вызванного оксидом азота;
- ✧ повышение уровня мочевой кислоты как главного компонента, определяющего антиоксидантную активность плазмы;
- ✧ усиление антиоксидантных свойств низкомолекулярных антиоксидантов путем образования комплексов с флавоноидами.

1.3.1.1. Радиал-связывающая активность (РСА)

Молекулы полифенолов имеют три области, ответственные за радиал-связывающие свойства (Рисунок 4): 1) катехольная группа – группа из двух соседних гидроксильных групп в кольце В; 2) 2,3-двойная связь, конъюгированная с 4-оксо группой, которая необходима для делокализации неспаренного электрона от В кольца; 3) ОН-группы в положениях 3 и 5, которые осуществляют захват радикалов (Terao, 2009).



Рисунок 4. Группы, ответственные за связывание свободных радикалов в молекуле кверцетина (Terao, 2009).

Гидроксильные катехольной группы кольца В или ОН-группа в положении С-3 могут быть первичной мишенью различных оксидантов (Рисунок 5). При окислении этих групп вначале образуются короткоживущие семихиноновые анион-радикалы, а затем ортохиноны. Считается, что эти группы вовлекаются в единый процесс внутримолекулярных превращений (Тараховский и др., 2013).

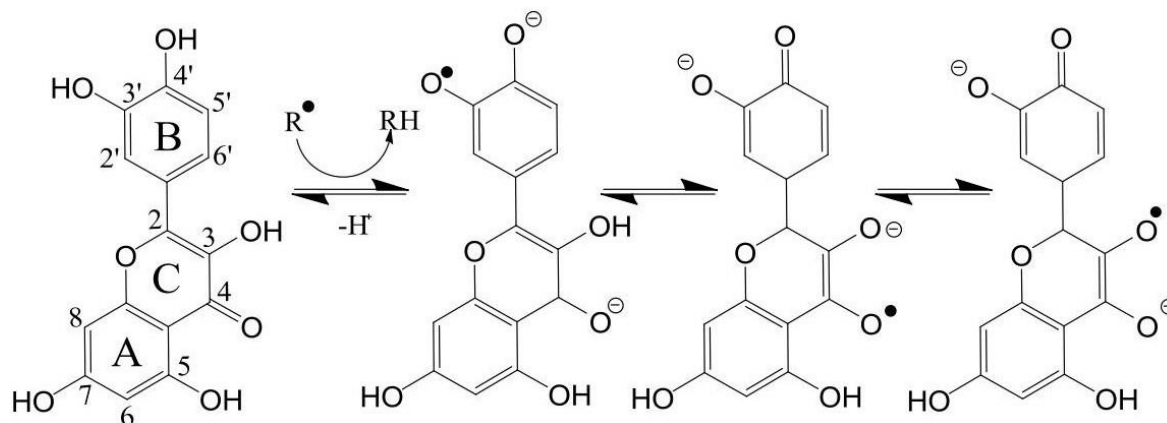


Рисунок 5. Молекулярные превращения кверцетина, вызванные атакой радикалов катехольной группы В кольца (Тараховский и др., 2013).

В отличие от типичных антиоксидантов, таких как витамины С и Е или полифенолы, экдистероиды не имеют активных гидроксильных групп. Однако известно, что экдистероиды, выделенные из *Serratula strangulate*, *Silene guntensis* и *Chenopodium quinoa*, способны связывать стабильные радикалы 2,2'-азобис (2-амидинопропан) дигидрохлорида (или ААРН), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида (или DPPH) и фенокси-радикалы гальвиноксила (Cai *et al.*, 2002; Nsimba *et al.*, 2008; Mamadalieva *et al.*, 2011). Наиболее активным атомом водорода экдистероидов может быть Н-9, который является аллильным и легко отнимается свободными радикалами. Был предложен механизм РСА экдистероидов:

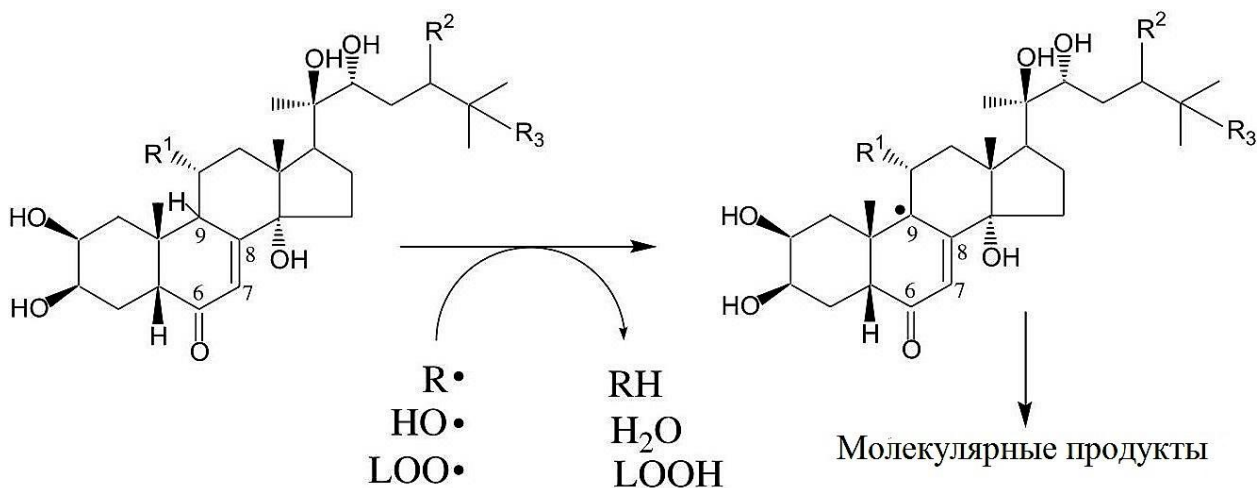


Рисунок 6. Предполагаемый антирадикальный механизм действия экдистероидов (Cai *et al.*, 2002).

Считается, что чем выше количество гидроксильных и метильных групп в молекуле экдистероидов, тем сильнее их антиоксидантная активность (Nsimba *et al.*, 2008).

1.3.1.2. Металл-хелатирующая способность полифенолов и экдистероидов

Существует несколько сайтов связывания металлов в молекулах полифенолов, положение которых определяется наличием расположенных рядом пар гидроксильных или карбонильных групп (Рисунок 7). Такими сайтами могут быть пара 3- и 4-ОН-групп кольца В. Также в связывании металлов могут принимать участие 3-гидроксильная и 4-карбонильная группы

кольца С или 5-гидроксильная и 4-карбонильная группы, принадлежащие кольцам А и С (Procházková *et al.*, 2011).

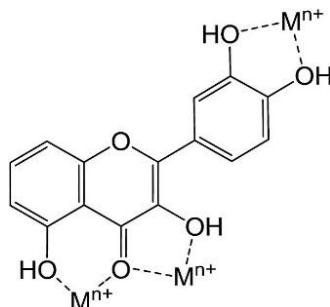


Рисунок 7. Сайты связывания ионов металлов в молекулах флавоноидов (Procházková *et al.*, 2011).

При образовании комплексов с металлами флавоноиды более эффективно перехватывают супероксидный радикал (de Souza, Giovani, 2004). Этот эффект объясняется тем, что ион металла в комплексе с полифенолом действует как супероксид-дисмутирующий каталитический центр, принимая и отдавая электроны в реакции с $O_2^{\cdot-}$:

1. $Me^{(n+1)+}-ПФ + O_2^{\cdot-} \rightarrow Me^{n+}ПФ + O_2$,
2. $Me^{n+}-ПФ + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow Me^{(n+1)+}-ПФ + H_2O_2$.

Механизм хелатирующей активности экдистероидов остается недостаточно изученным. Предполагается, что экдистероиды выступают в качестве хелаторов Fe^{2+} главным образом за счет атома кислорода карбонильной группы, связанной двойной связью с С-7. Атомы кислорода гидроксильных групп вносят меньший вклад в хелатирующую способность экдистероидов (Nsimba *et al.*, 2008).

1.3.1.3. Взаимодействие полифенолов и экдистероидов с клеточными мембранами

Взаимодействие полифенолов с мембранами и способность проникать в клетки является важным свойством, определяющим их фармакологическую активность. Флавоноиды способны изменять физические свойства фосфолипидного бислоя, модулировать активность ферментов и лиганд-рецепторные взаимодействия, влиять на ионные потоки, сигнальную

трансдукцию, транспорт и другие мембранно-связанные процессы (Fraga *et al.*, 2009). При взаимодействии с липидным бислоем полифенолы способствуют сохранению нормальной структуры мембран и защищают клетки в условиях окислительного стресса, связывая свободные радикалы и ингибируя перекисное окисление липидов (Oteiza *et al.*, 2005). Танины способны инициировать адгезию мембран, образуя мостики между двумя соседними мембранами. Экдистероиды могут взаимодействовать с мембранами, включаясь в липидный бислой (Lafont, Dinan, 2003; Щулькин и др., 2012).

1.3.1.4. Действие полифенолов и экдистероидов на антиоксидантные системы клетки

В последние годы накапливается все больше данных, что полифенолы оказывают антиоксидантное действие путем влияния на активность собственных антиоксидантных систем клетки. Показана способность полифенолов индуцировать NADPH-хиноноксидоредуктазу, глутатион-S-трансферазу, UDP-глюкуронозилтрансферазу, глутатионпероксидазу, супероксиддисмутазу и каталазу, которые являются основными ферментами антиоксидантной защиты (Nagata *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2006; Kaviarasan *et al.*, 2008; Smirnova *et al.*, 2009; Lambert, Elias, 2010; Procházková *et al.*, 2011). Способность флавоноидов активировать антиоксидантные ферменты коррелирует с их окислительно-восстановительными свойствами. Полифенолы с более высоким редокс-потенциалом (кверцетин и мирицетин) являются более мощными индукторами экспрессии антиоксидантных генов. Степень индукции антиоксидантных ферментов зависит от вида исследуемого полифенола и типа изучаемых клеток (Breinholt *et al.*, 1999).

По сравнению с полифенолами влияние экдистероидов на системы антиоксидантной защиты клеток изучено в гораздо меньшей степени. Показано, что 20Е индуцирует активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, ингибирует экспрессию NO-синтезы и подавляет

активацию ASK1-MKK4/7-JNK стрессового сигнального пути, вызванную окислительным стрессом (Feng *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012).

1.3.2. Проксидантные и токсические свойства полифенолов и экдистероидов

В аэробных условиях полифенолы могут подвергаться аутоокислению с образованием активных форм кислорода и выступать в качестве прооксидантов. Вероятность аутоокисления возрастает при высоких значениях pH, высоких концентрациях фенольных соединений и наличии металлов с переменной валентностью (Canada *et al.*, 1990; Halliwell, 2008; Procházková *et al.*, 2011; Eghbaliferiz, Iranshahi, 2016). Предполагается, что прооксидантная активность прямо пропорциональна общему количеству гидроксильных групп в молекуле флавоноидов (Cao *et al.*, 1997). Наличие 2.3-двойной связи и 4-оксо положения в структуре флавоноидов способствует образованию АФК. Продукция АФК может усиливаться в ходе реакций полифенолов с оксидантами (Hayakawa *et al.*, 2004; Lambert, Elias, 2010) и восстановителями (Galati *et al.*, 2002).

Цитотоксическое действие полифенолов тесно связано с их способностью продуцировать АФК, которые в присутствии металлов с переменной валентностью образуют чрезвычайно токсичные гидроксильные радикалы $\text{OH}^\bullet$ в ходе реакции Фентона (León-González *et al.*, 2015). Показано, что в присутствии АФК флавоноиды кверцетин, нарингенин, гесперетин, морин, ресвератрол и катехин индуцируют одноцепочечные разрывы ДНК (Ohshima *et al.*, 1998; Yen *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2005; Lambert, Elias, 2010). Предложен механизм сайт-специфического повреждения ДНК, вызванного кверцетином. Катехольная группа в А или В кольце кверцетина окисляется Cu^{2+} и связывается с ДНК, медь в свою очередь может генерировать АФК, ответственные за повреждение ДНК (Yamashita *et al.*, 1999).

Показано, что в опухолевых клетках полифенолы могут снижать активность антиоксидантных ферментов, благодаря чему наблюдается ингибирование их пролиферации и апоптоз (Lambert, Elias, 2010; Chen *et al.*,

2012). Вместе с тем, низкие дозы оксидантов, продуцируемые при аутоокислении полифенолов, могут вызывать адаптивный ответ, активируя антиоксидантные системы клеток и повышая их устойчивость к последующему воздействию летальных доз оксидантов (Октябрьский, Смирнова, 2007; Halliwell, 2008; Smirnova *et al.*, 2009).

В отличие от полифенолов, прооксидантная и цитотоксическая активность экдистероидов изучена в гораздо меньшей степени. Выполняя функции гормонов у членистоногих, фитоэкдистероиды оказывают различное, в том числе токсическое, влияние на насекомых (Nyamoita, 2013). Однако даже в высоких концентрациях фитоэкдистероиды не являются токсичными для млекопитающих (Lafont, Dinan, 2003). Имеются данные о низком токсическом влиянии экдистероидов на различные клеточные линии человека (Mamadaliyeva *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2015). Экдистероид стахстерол из *Stachyurus himalaicus* проявлял выраженную цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток Hela (Wang *et al.*, 2007). Экдистероиды из семян *Chenopodium quinoa* ингибировали коллагеназу (Nsimba *et al.*, 2008).

1.3.3. Методы оценки антиоксидантной активности полифенолов и экдистероидов

Традиционная схема анализа антиоксидантных свойств исследуемых субстратов включает ряд химических методов. Однако только химических методов недостаточно для того, чтобы выяснить будет ли данный субстрат проявлять свои антиоксидантные свойства *in vivo*. Для исследования антиоксидантной активности на клеточном уровне применяют тест-системы, использующие культуры клеток млекопитающих и микроорганизмов (López-Alarcón, Denicola, 2013). При этом оценивается не только способность испытуемого субстрата снижать степень окислительного стресса, но и его влияние на активацию или репрессию транскрипционных факторов и ферментов, модулирующих ответ на стресс. Ни один из используемых методов

не может обеспечить однозначные результаты, и наилучшим решением является комбинация различных подходов (Carocho, Ferreira, 2013).

Химические методы определения АОА классифицируют в зависимости от типа реакций, лежащих в их основе: НАТ (hydrogen atom transfer) – перенос протона и ЕТ (electron transfer) – перенос электрона (Apak *et al.*, 2013). К первой группе относятся ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter), TOSCA (total oxyradical scavenging capacity assay), ингибирование окисления липопротеинов низкой плотности и др. (Gülçin, 2012). В большинстве ЕТ-методов определяется способность антиоксиданта реагировать с флуоресцентным или окрашенным окислителем, который при восстановлении изменяет цвет. К таким методам относятся ТЕАС (trolox equivalence antioxidant capacity), FRAP (ferric ion reducing antioxidant power), CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant power), связывание радикалов DPPH[•], ABTS^{•+}, DMPD^{•+} и др. (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Apak *et al.*, 2013).

В большинстве тест-систем, основанных на культурах клеток, АОА оценивается по способности испытуемого субстрата прямо или косвенно снижать уровень окислительного стресса (Wolfe, Liu, 2007). В качестве модели используются опухолевые клетки человека HepG2, Caco-2, AGS, эндотелиальные клетки EA.hy926, фибробласты легкого (WI38, IMR-90), эритроциты и другие (López-Alarcón, Denicola, 2013). Широко применяются тест-системы, основанные на использовании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и бактерий *Escherichia coli* (Dani *et al.*, 2008; Smirnova *et al.*, 2009, 2010; Oktyabrsky *et al.*, 2009). В качестве маркера окислительного стресса может использоваться накопление продуктов окисления биомолекул: карбонильных групп в белках (Halliwell, Whiteman, 2004), изопростанов, малонового диальдегида и других продуктов перекисного окисления липидов (Wood *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2013), а также 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина как продукта окисления ДНК (Wood *et al.*, 2006; Loft *et al.*, 2008). Одним из наиболее чувствительных и точных способов измерения окислительного повреждения ДНК является гель-электрофорез одиночных клеток, известный

как comet assay (Collins, 2009). Для оценки влияния испытуемых субстратов на антиоксидантные системы клеток измеряют уровень экспрессии антиоксидантных генов и активность ферментов, таких как глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза, изменение уровня глутатиона (GSH) (Oktyabrsky *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2009, 2010; Alam *et al.*, 2013).

1.4. Биодоступность и влияние полифенолов и экидистероидов на живые организмы

1.4.1. Биодоступность полифенолов

Эффекты полифенолов на организм человека напрямую зависят от биодоступности этих соединений. Существуют значительные вариации в поглощении различных классов полифенолов, общая схема представлена на рисунке 8 (Marín *et al.*, 2015).

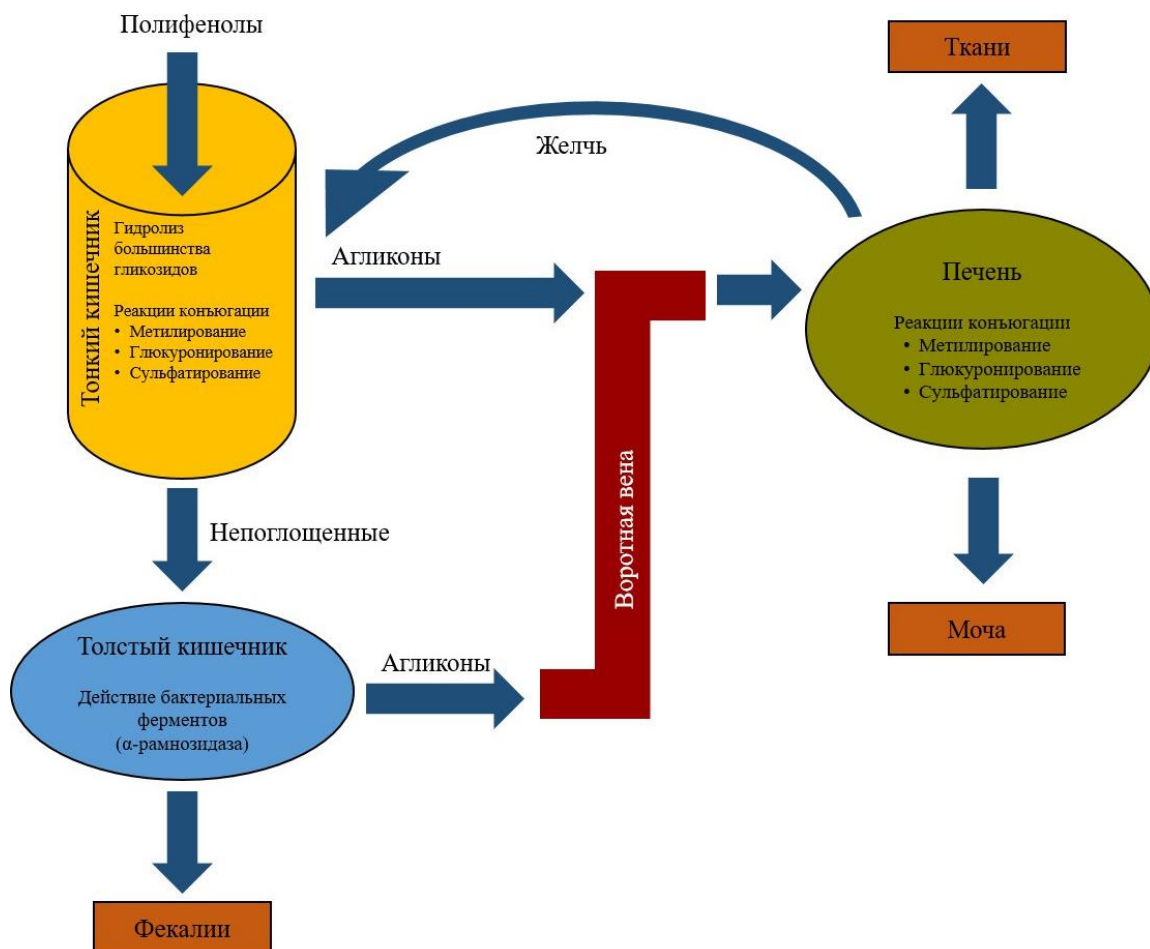


Рисунок 8. Поглощение и метаболизм полифенолов и их производных в организме человека (Marín *et al.*, 2015).

Большинство фенольных соединений присутствуют в виде сложных эфиров, гликозидов или полимеров, и не могут непосредственно проникать в клетки. Для этого они должны быть гидролизованы ферментами кишечника или присутствующими в нем микроорганизмами (Gee *et al.*, 1998; Erk *et al.*, 2014; Bang *et al.*, 2015). Только 10-20% полифенолов способны поглощаться в тонком кишечнике (Celcer *et al.*, 2013). Агликоны проникают в эпителиальные клетки путем пассивной диффузии и под действием соответствующих трансфераз энтероцитов, подвергаются метилированию, сульфатированию или глюкуронированию (D'Archivio *et al.*, 2010; Marín *et al.*, 2015). Затем эти продукты поступают в кровоток по воротной вене, достигая печени. Здесь они могут подвергаться дополнительной II фазе метаболизма, конъюгироваться и транспортироваться снова в кровь, пока не выведутся с мочой. Некоторые из конъюгатов, образующихся в печени, выводятся из организма в виде желчных компонентов обратно в кишечник, где восстанавливаются ферментами кишечных бактерий, прежде чем поглотятся вновь (Auga, 2008). Такой enteroгепатический круговорот обеспечивает более длительное нахождение этих веществ в организме человека и животных. Выведение конъюгатов флавоноидов из организма происходит через мочевые пути. Таким образом, большая часть полифенолов попадает в плазму крови в модифицированном состоянии, утрачивая свои редокс-активные свойства. Это существенно затрудняет интерпретацию данных о механизмах действия полифенолов, полученных на культурах клеток.

1.4.2. Биодоступность фитоэкдистероидов

Данные о метаболизме экдистероидов в организме млекопитающих являются ограниченными и носят фрагментарный характер (Lafont, Dinan, 2009). Экдистероиды быстро всасываются и метаболизируются и имеют низкую токсичность. У мышей летальная доза (ЛД₅₀) 20Е составляет 6.4 г/кг при внутрибрюшинном и ЛД₅₀ > 9 г/кг при пероральном введении (Matsuda *et al.*, 1970; Ogawa *et al.*, 1974). Предполагается, что метаболизм экдистероидов

осуществляется с участием печени и микроорганизмов кишечника (Lafont, Dinan, 2003). Основным идентифицированным метаболитом является 14-дезоксизекдизон, а также молекулы с полностью восстановленным и эпимеризованным в положении 3 В-кольцом (Tsitsimpikou *et al.*, 2001). Считается, что модификация В-кольца и дегидроксилирование являются общими механизмами метаболизма экдистероидов у млекопитающих. Немодифицированные экдистероиды и продукты их метаболизма выводятся из организма через фекальный и мочевой пути (Hikino *et al.*, 1972; Dzukharova *et al.*, 1987; Lafont *et al.*, 1988). Период полувыведения зависит от вида организма и способа введения экдистероидов (Dzukharova *et al.*, 1987; Simon, Koolman, 1989; Albanese *et al.*, 2000). Анализ фекальных метаболитов мышей показал, что около 45% экдизона выводится в неизменной форме (Girault *et al.*, 1988; Lafont *et al.*, 1988).

1.4.3. Терапевтические эффекты полифенолов и экдистероидов

Эксперименты, выполненные на культурах клеток и тканей, выявили многочисленные терапевтические эффекты, проявляемые полифенолами: кардиопротекторный, нейропротекторный, противовоспалительный, противоопухолевый, гепатопротекторный, иммунопротекторный, антибактериальный, противодиабетический, защита эпителиальных клеток, гормональная регуляция и другие (Han *et al.*, 2007). В основе наблюдаемых эффектов лежат такие механизмы, как прямая нейтрализация АФК и взаимодействие с мембранами клеток (Fraga *et al.*, 2010). Однако действие этих механизмов в целостном организме может быть ограничено низкой концентрацией немодифицированных полифенолов в плазме крови. В этой связи большой интерес вызывают исследования регуляторной роли полифенолов. Показана способность полифенолов влиять на клеточный цикл, ингибировать окислительные ферменты, вызывать индукцию эндогенных антиоксидантных систем, изменять редокс-статус клеток и модулировать клеточные сигнальные пути, такие как Keap1-Nrf2-ARE регуляторный путь,

который приводит к индукции генов, участвующих в защите от окислительного и ксенобиотического стресса (Han *et al.*, 2007; Christensen, Christensen, 2013).

Эффекты фитоэкдистероидов на культуры клеток и организм в целом изучены в меньшей степени. Они влияют на основные метаболические пути у млекопитающих: синтез белков, липидный и углеводный метаболизм и ионные потоки (Báthori *et al.*, 2008). Экдистероиды оказывают защитное, корректирующее, тонизирующие и профилактическое действие, проявляя гепатопротекторные, иммунопротекторные, антиоксидантные и противодиабетические свойства. Показано, что экдистероиды повышают физическую работоспособность, жизнеспособность и устойчивость к стрессу и старению, то есть выступают как адаптогены (Lafont, Dinan, 2003). Механизм воздействия экдистероидов на клетки млекопитающих изучен слабо. Являясь гормонами членистоногих, они не имеют соответствующих рецепторов в клетках млекопитающих, однако могут оказывать влияние, воздействуя на синтез простагландинов (Mykhaylyk *et al.*, 2001; Kotsyuruba *et al.*, 1995). Показано также, что экдистероиды вызывают значительные изменения экспрессии генов, в результате чего происходит активация PI3K/Akt сигнального пути, отвечающего за антиапоптотические эффекты, пролиферацию и метаболизм клеток (Constantino *et al.*, 2001; Oehme *et al.*, 2006).

1.4.4. Влияние полифенолов и экдистероидов на жизнедеятельность бактерий

В настоящее время совокупная микробиота организма рассматривается как важный метаболический орган. Показано, что несбалансированный состав микробиоты приводит к различным расстройствам и хроническим заболеваниям (Dueñas *et al.*, 2015; Espín *et al.*, 2017). По разным оценкам в желудочно-кишечном тракте обитают 500-1000 видов микроорганизмов (до 10^{12} КОЕ/г в толстом кишечнике) (Cardona *et al.*, 2013). В отличие от клеток хозяина, бактерии в кишечнике подвергаются воздействию высоких

концентраций немодифицированных полифенолов, экистероидов и их метаболитов. Суточная доза потребления природных полифенолов варьирует от 100 мг до 2 г, при этом до 95% из них достигает кишечника (Clifford, 2004). Показано, что полифенолы могут влиять на видовой состав микробиоты, подавляя рост одних видов бактерий и стимулируя рост других (Celep *et al.*, 2013). Например, катехин значительно ингибировал рост *Clostridium histolyticum* и усиливал рост *Clostridium coccooides* и *Escherichia coli*, в то время как численность *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* spp. оставалась относительно постоянной (Tzounis *et al.*, 2008). Пища, богатая конденсированными танинами, приводила к изменению состава популяции кишечных бактерий у крыс в сторону преобладания грамотрицательных видов (*Bacteroides* и *Enterobacteriaceae*) и уменьшения грамположительных патогенов, например, *Clostridium leptum* (Smith, Mackie, 2004). Видовое разнообразие кишечных бактерий человека и животных существенно изменялось при действии чистых полифенолов, различных растительных экстрактов, зеленого и черного чая и вина (Dolara *et al.*, 2005; Tzounis *et al.*, 2008; Moco *et al.*, 2012; van Duynhoven *et al.*, 2013).

Бактериостатические и бактерицидные эффекты полифенолов связывают с их воздействием на клеточные мембраны, что приводит к нарушению структуры мембран, выходу калия и лизису клеток (Cushnie, Lamb 2005, 2011; Stapleton *et al.*, 2007). В ряде случаев было показано, что наблюдаемые эффекты были вызваны окислительными повреждениями компонентов мембран (Hoshino *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2003). Некоторые флавоноиды могут специфически взаимодействовать с белками бактериальных клеток, нарушая их функционирование. Например, эпикатехингаллат способен проникать в клетки *Staphylococcus aureus* и нарушать работу пенициллинсвязывающего белка, что повышает чувствительность штаммов, устойчивых к антибиотикам этого ряда (Bernal *et al.*, 2010). Галангин из альпинии лекарственной способствовал преодолению устойчивости *S. aureus* к антибиотикам, связанной с активностью β -

лактамазы. Аналогичной, но менее выраженной активностью обладали кверцетин и байкалеин (Eumkeb *et al.*, 2010).

Полифенолы способны нарушать работу генетического аппарата бактериальных клеток. Так эпигаллокатехингаллат ингибировал активность ДНК-гиразы (Gradisar *et al.*, 2007). Соевые изофлавоны инактивировали топоизомеразы I и II в цитоплазме *S. aureus*, приводя к двукратному снижению количества ДНК и РНК в клетке (Wang *et al.*, 2010). Антибактериальная активность кверцетина и апигенина была связана с их способностью ингибировать D-аланил–D-аланин-лигазу, конкурентно взаимодействуя с сайтом связывания ДНК (Wu *et al.*, 2008). Эпикатехин, силибинин, силимарин, римантадин, амантидин, байкалеин и морин ингибировали АТФ-синтазу F_1F_0 *E. coli* (Chinnam *et al.*, 2010). В целом, антибактериальные эффекты полифенолов реализуются за счет ингибирования функций цитоплазматической мембраны, подавления синтеза нуклеиновых кислот и угнетения энергетического метаболизма (Cushnie, Lamb, 2005, 2011; Тараховский и др., 2013).

Данные о влиянии экдистероидов на бактерии ограничены. Известно, что они не оказывают отрицательного воздействия на ассоциации микроорганизмов, обитающих в желудочно-кишечном тракте (Šelepová *et al.*, 1993; Тимофеев, 2006). Также фитоэкдистероиды, выделенные из растений родов *Lychnis*, *Serratula*, *Silene*, *Rhaponticum*, *Diploclisia*, не проявляли антимикробную активность в отношении большинства испытанных микробных культур, включая *Mycobacterium*, *Proteus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* и др. (Bandara *et al.*, 1989). Однако 20Е полностью подавлял рост *Micrococcus luteus* и *Erwinia caratovora*, причем введение ацильной группы во второе положение 20Е приводило к существенному увеличению антимикробной активности по отношению к патогенным микроорганизмам (Ahmad *et al.*, 1996; Ширшова и др., 2006). Механизм воздействия экдистероидов на микроорганизмы остается неизвестным.

ГЛАВА 2. СТРЕССОВЫЕ РЕГУЛОНЫ *ESCHERICHIA COLI*

В предыдущей главе было показано, что полифенолы и фитоэкдистероиды могут оказывать влияние на метаболические процессы и вызывать повреждения бактериальных клеток. Такое влияние должно сопровождаться изменением экспрессии генов, прежде всего тех, которые принадлежат к стрессовым регулонам. В данной главе рассматриваются защитные системы и стрессовые регулоны, индуцируемые при окислительном стрессе, общем стрессовом ответе и SOS-ответе в клетках *E. coli*.

2.1. Адаптация *E. coli* к окислительному стрессу

2.1.1. Активные формы кислорода

Неизбежными побочными продуктами аэробного метаболизма являются активные формы кислорода, такие как супероксидный радикал ($O_2^{\bullet-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($OH^{\bullet}$) и гидроперекиси ($ROOH$), которые образуются в результате поэтапного одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода (Рисунок 9) (González-Flecha, Demple, 1995; Davies, 1995, 2000; Lushchak, 2001; Imlay, 2002).

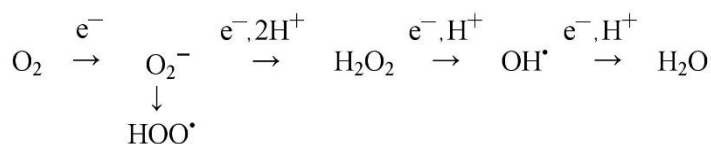


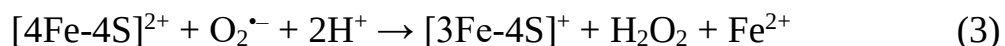
Рисунок 9. Четырехэлектронное восстановление молекулярного кислорода в биологических системах (Farr, Kogoma, 1991).

В живых организмах $O_2^{\bullet-}$ образуется при функционировании электрон-транспортной цепи в результате постоянного окисления и восстановления хинонов, создавая непрерывный поток $O_2^{\bullet-}$. Образующийся в клетках $O_2^{\bullet-}$ подвергается быстрой дисмутации с образованием перекиси водорода. Дисмутация может протекать спонтанно или с участием ферментов супероксиддисмутаза, которые существенно увеличивают скорость процесса (1). Важным свойством, определяющим биологическую активность

супероксида, является его способность восстанавливать ионы переходных металлов и их комплексов (2) (Fridovich, 1989; Farr, Kogoma, 1991):



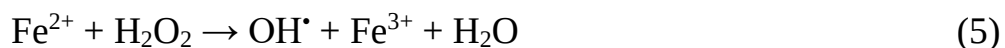
Белки, содержащие $[\text{Fe-S}]_4$ кластеры очень чувствительны к воздействию $\text{O}_2^{\bullet-}$ (3) (Davies, 1995). Данная реакция способствует высвобождению Fe^{2+} , тем самым повышая пул внутриклеточного свободного железа.



Супероксидный радикал может протонироваться с образованием более реакционноспособного гидропероксильного радикала (4):



В отличие от супероксидного радикала, который несет отрицательный заряд и не может проходить через заряженную цитоплазматическую мембрану, перекись водорода является нейтральной молекулой, что позволяет ей легко проникать внутрь клеток, поэтому пероксидный стресс возрастает при увеличении концентрации H_2O_2 во внеклеточном пространстве. Эндогенная H_2O_2 образуется в результате аутоокисления ферментов дыхательной цепи, дисмутации $\text{O}_2^{\bullet-}$ и фотохимических реакций (Seaver, Imlay, 2004; Imlay, 2008). В основе повреждающего действия перекиси водорода лежит ее реакция с редокс-активными ионами внутриклеточного двухвалентного железа с образованием высокотоксичного гидроксильного радикала в реакции Фентона (5).



Образующийся $\text{OH}^{\bullet}$ быстро реагирует с большинством биомолекул вблизи сайтов своего формирования (Pryor, 1986; Imlay *et al.*, 1988; Imlay, Linn, 1988).

Продукция гидроксильного радикала может также осуществляться в ходе реакции между перекисью водорода и супероксидным радикалом в присутствии ионов переходных металлов (реакция Хабер-Вейса) (Kehrer, 2000):



2.1.2. Повреждения, вызываемые АФК

АФК проявляют токсическое действие в отношении любых типов клеток, клеточных структур и биомолекул, включая ДНК, РНК, белки и липиды (Halliwell, Aguoma, 1991; Меньщикова и др., 2006; Imlay, 2008). Присутствие железа в сахарофосфатном остове способствует образованию $\text{OH}^{\bullet}$ вблизи ДНК в ходе реакции Фентона. Взаимодействие $\text{OH}^{\bullet}$ с остатками сахаров приводит к их фрагментации, потере оснований, образованию одно- и двуцепочечных разрывов ДНК, которые блокируют репликацию и могут вызывать гибель клеток (Imlay, Linn, 1988; Sies, 1993; Demple, Harrison, 1994).

Взаимодействуя с полиненасыщенными жирными кислотами мембран, свободные радикалы могут инициировать перекисное окисление липидов, скорость которого прямо зависит от количества ненасыщенных $\text{C}=\text{C}$ связей. Однако бактериальные мембраны содержат преимущественно насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты, что делает их более устойчивыми к перекисному окислению, по сравнению с мембранами эукариот (Farr, Kogoma, 1991). Окисление липидов протекает по типу цепной реакции и приводит к образованию вторичных стрессоров, главным образом пероксильных и алкоксильных радикалов ($\text{LOO}^{\bullet}$ и $\text{LO}^{\bullet}$). При окислении липидов происходит укорочение цепочек жирных кислот, результатом которого является нарушение текучести мембран. Увеличение текучести мембран способствует снижению мембранного потенциала, возникновению осмотического дисбаланса, нарушению барьерных свойств. В итоге такие изменения могут приводить к значительным повреждениям мембран и связанных с мембраной белков и даже к гибели клеток (Cabiscol *et al.*, 2000; Stark, 2005).

АФК способны окислять аминокислотные остатки в составе белков, что приводит к изменению их структуры и свойств. Некоторые аминокислотные остатки окисляются до пероксидных форм, например, тирозин до тирозингидропероксида, гистидин до 2-оксогистидина; они могут

превращаться в другие аминокислоты, например, пролин в глутаминовую кислоту, метионин окисляется до сульфоксида, цистеин в цистин, что приводит к его димеризации и образованию S-S связей в белках. Другие аминокислоты также могут быть димеризованы, например, тирозин в битирозин. Повреждения основной углеродной цепи происходят преимущественно по остаткам пролина или глицина и могут приводить к фрагментации молекулы белка (Berlett, Stadman, 1997; Sigler *et al.*, 1999).

АФК, в особенности супероксидный радикал, способны вызывать окислительные повреждения ферментов дегидратаз, содержащих [4Fe-4S] кластеры, в первую очередь аконитазы, фумаразы. Окисляемый кластер становится неустойчивым, и субстрат-координирующий атом железа диссоциирует, что приводит к потере ферментативной активности белков (Gardner, Fridovich, 1991; Imlay, 2013).

2.1.3. Механизмы защиты от окислительного стресса

Живые организмы, в том числе бактерии, выработали различные защитные и репаративные механизмы, которые позволяют сохранять концентрацию свободных радикалов на низком уровне и восстанавливать повреждения, возникающие при окислительном стрессе (Sies, 1997; Cabiscol *et al.*, 2000; Halliwell, 2006; Lushchak, 2011). В нейтрализации АФК участвуют низкомолекулярные соединения и антиоксидантные ферменты. К низкомолекулярным соединениям с антиоксидантными функциями можно отнести пул восстановительных эквивалентов NADPH и NADH, каротиноиды, аскорбиновую кислоту (витамин С), α -токоферол (витамин Е), ретинол (витамин А), убихинон и глутатион (GSH) (Sigler *et al.*, 1999). GSH, содержащийся в клетках в высоких концентрациях, является основным среди низкомолекулярных антиоксидантов. Он может прямо реагировать с H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}^{\cdot}$ и $\text{HOO}^{\cdot}$, образуя стабильный радикал $\text{GS}^{\cdot}$, который димеризуется с образованием GSSG, впоследствии восстанавливаемый глутатионредуктазой с использованием NADPH (Sies, 1997).

Основная доля образующихся АФК нейтрализуется с участием конститутивных и индуцибельных антиоксидантных ферментов. В первую очередь это супероксиддисмутазы (SOD), гидропероксидредуктазы и пероксидазы (Fridovich, 1989; Farr, Kogoma, 1991).

Супероксиддисмутазы являются главными деструкторами $O_2^{\bullet-}$, катализирующими его дисмутацию до H_2O_2 и O_2 . Клетки *E. coli* снабжены тремя супероксиддисмутазами SodA, SodB и SodC, содержащими различные металлы в активном центре: MnSOD, FeSOD и CuZnSOD, кодируемые генами *sodA*, *sodB* и *sodC* соответственно (Britton, Fridovich, 1977). Супероксиддисмутазы различаются по характеру регуляции, внутриклеточной локализации и выполняемым функциям. MnSOD и FeSOD локализованы в цитоплазме, в то время как CuZnSOD находится в периплазматическом пространстве. Ген *sodA* контролируется несколькими глобальными транскрипционными регуляторами (ArcAB, Fnr, SoxRS, MarRAB, Fur и IHF), вклад каждого из которых определяется условиями окружающей среды (Touati, 1997). В анаэробных условиях *sodA* репрессируется регуляторными белками Fnr и ArcAB. При окислительном стрессе и действии ксенобиотиков экспрессия *sodA* индуцируется под контролем SoxRS и MarRAB. Регулятор ассимиляции железа Fur ингибирует экспрессию *sodA*. Экспрессия *sodB* осуществляется как в аэробных, так и в анаэробных условиях и находится под положительным контролем Fur (Touati, 1997). Между цитоплазматическими супероксиддисмутазами существуют некоторые функциональные различия: FeSOD более эффективна в защите 4Fe-4S кластеров ферментов, в то время как MnSOD более эффективно предотвращает мутагенные повреждения ДНК, вызванные редокс-активными соединениями (Steinman *et al.*, 1994; Touati, 1997). CuZnSOD синтезируется при переходе клеток в стационарную фазу и защищает их от различных источников супероксидного радикала, поступающих извне или синтезируемых в периплазме. Считается, что CuZnSOD позволяет патогенным микроорганизмам противостоять

окислительному взрыву при иммунном ответе организма-хозяина (De Groote *et al.*, 1997; Korshunov, Imlay, 2006).

Гидропероксидазы, или каталазы, являются неотъемлемой частью ответа бактериальной клетки на пероксидный стресс. Клетки *E. coli* имеют две различные каталазы. KatG (продукт гена *katG*) является бифункциональной гидропероксидазой I (HPI) с каталазной и пероксидазной активностью. Каталаза HPI индуцируется при повышении концентрации перекиси водорода (Christman *et al.*, 1989) и является основным деструктором H_2O_2 при ее высоких концентрациях (Seaver, Imlay, 2001). Монофункциональная KatE, гидропероксидаза II (HPII), кодируемая геном *katE*, проявляет только каталазную активность, не отвечает на повышение H_2O_2 , но значительно индуцируется в стационарной фазе, поскольку находится под контролем σ^S субъединицы РНК-полимеразы RpoS (Loewen, Switala, 1986; Loewen *et al.*, 1990). Эндогенная H_2O_2 в основном нейтрализуется ферментом алкилгидропероксидредуктазой (AhpCF), обладающей высоким сродством к перекиси водорода (Seaver, Imlay, 2001). AhpCF представляет собой двухкомпонентную (AhpC-AhpF) NADH-пероксидазу, которая переносит электроны от NADH к H_2O_2 . Предполагается, что AhpCF обеспечивает дополнительную защиту клеток за счет снижения концентрации органических гидропероксидов (Christman *et al.*, 1989). Вместе с супероксиддисмутазами и алкилгидропероксидредуктазами каталазы ограничивают накопление АФК в клетке, расщепляя H_2O_2 до воды и молекулярного кислорода, и тем самым уменьшают риск образования опасного гидроксильного радикала $OH^\bullet$ (Schellhorn, 1995).

2.1.4. Адаптивный ответ на окислительный стресс

Адаптивный ответ организмов, включая бактерий, на окислительный стресс происходит путем активации множества генов, позволяющих клетке поддерживать гомеостаз в изменяющихся условиях. *Escherichia coli* имеет два глобальных транскрипционных регулятора OxyR и SoxRS, активирующихся

во время окислительного стресса (Pomposiello, Demple, 2001; Chiang, Shellhorn, 2012).

OxyR представляет собой транскрипционный регулятор, активирующийся при повышении концентрации H_2O_2 и контролирующей экспрессию порядка 40 генов, продукты которых участвуют в деструкции перекиси водорода (*katG*, *ahpCF*), метаболизме железа (*fur*, *dps*, *suf* оперон), поддержании редокс-баланса (*gor*, *grxA*, *trxC*), репаративных процессах и др. (Altuvia *et al.*, 1997; Pomposiello, Demple, 2001; Chiang, Schellhorn, 2012; Imlay, 2013). Белок OxyR относится к семейству LysR транскрипционных факторов и постоянно присутствует в клетке в виде гомотетрамера, состоящего из двух доменов (Christman *et al.*, 1989). Активация OxyR в присутствии H_2O_2 происходит в результате окисления остатка Cys199 до сульфеновой кислоты с образованием дисульфидной связи с Cys208. Активированный OxyR связывается с РНК-полимеразой и позитивно регулирует транскрипцию зависимых генов (Storz *et al.*, 1990, Lee *et al.*, 2004; Chiang, Schellhorn, 2012). Инактивация происходит путем восстановления дисульфидной связи с участием глутаредоксина I и глутатиона (Zheng *et al.*, 1998). Изменение внутриклеточного редокс-баланса в сторону повышения уровня окисленных форм (дисульфидный стресс) также может вызывать активацию OxyR и индукцию регулируемых им генов (Aslund *et al.*, 1999).

Индукция регулона, подконтрольного регуляторам SoxR и SoxS, происходит при экспозиции *E. coli* к супероксид-генерирующим агентам, таким как паракват и менадион. Белок SoxR продуцируется конститутивно и в ответ на обработку генераторами супероксида активирует экспрессию гена *soxS*. Увеличение концентрации белка SoxS и его связывание с промоторами приводит к индукции порядка 60 генов SoxRS регулона, к числу которых относятся *sodA* (MnSOD), *acrAB* (помпа, осуществляющая выход ксенобиотиков) и гены, продукты которых участвуют в метаболизме железа (*fldA*, *fldB*, *fpr*, *fur*) и репарации ДНК (Wu, Weiss, 1991; Hidalgo, Demple, 1996; Touati, 2000; Pomposiello, Demple, 2001; Chiang, Schellhorn, 2012; Imlay, 2015).

Принадлежащий к MerR семейству регуляторных белков SoxR является гомодимером, который имеет два [2Fe-2S] кластера. [2Fe-2S] кластеры SoxR могут обратимо окисляться и восстанавливаться, но только окисленная форма SoxR является активатором транскрипции, специфичным для *soxS* промотора, участвуя в образовании открытого комплекса связывания РНК-полимеразы (Hidalgo, Demple, 1996). Механизм окисления и последующего восстановления редокс-кластеров SoxR остается недостаточно изученным. Таким образом, OxyR и SoxR принадлежат к редокс-чувствительным белкам, окислительная модификация которых является сигналом для индукции подконтрольных антиоксидантных генов и формирования адаптивного ответа на окислительный стресс.

2.2. Общий стрессовый ответ

Быстрая адаптация бактерий к различным изменениям среды обитания осуществляется с помощью ряда глобальных регуляторных сетей, которые контролируют одновременную экспрессию большого количества генов, что приводит к глубоким физиологическим и морфологическим изменениям, обеспечивающим выживание в стрессовых условиях (Battesti *et al.*, 2011; Hengge, 2011; Ткаченко, 2012; Ron, 2013).

Важнейшая регуляторная сеть, которая обеспечивает переход бактерий в стационарную фазу роста и адаптацию к различным стрессовым воздействиям (голодание, высокая осмолярность, температурные стрессы, снижение pH), контролируется альтернативной сигма-субъединицей РНК-полимеразы (σ^S или RpoS) (Hengge-Aronis, 2002). RpoS регулирует экспрессию около 500 генов, что составляет примерно 10% генома *E. coli*, образуя глобальный регулон общего стрессового ответа (Weber, *et al.*, 2005; Hengge, 2009). В основе регуляции лежит изменение внутриклеточной концентрации и активности RpoS, которая контролируется на уровне транскрипции, трансляции, протеолиза и активности белка (Hengge-Aronis, 2002; Hengge, 2008).

Регуляция транскрипции *rpoS* носит сложный характер и находится под контролем других глобальных транскрипционных факторов. Комплекс cAMP-CRP может положительно или отрицательно влиять на экспрессию *rpoS* в зависимости от условий. Транскрипционный фактор ArcA репрессирует, а повышение концентрации гуанозинтетрафосфата (p)ppGpp индуцирует экспрессию *rpoS* (Lange, Hengge-Aronis, 1994). Стимуляция транскрипции *rpoS* также отмечается при накоплении полифосфатов (Traxler *et al.*, 2008). Дополнительно транскрипция *rpoS* регулируется транскрипционными факторами BarA/UvrY, которые положительно регулируют транскрипцию *rpoS*, связываясь с промоторным регионом в постэкспоненциальную фазу роста (Hengge, 2008; Battesti *et al.*, 2011).

мРНК *rpoS* содержит длинную нетранслируемую область на 5'-конце, которая играет важную роль в регуляции ее стабильности и трансляции. Под действием стрессовых факторов различные белки и другие регуляторные соединения дестабилизируют вторичную структуру мРНК *rpoS*, повышая ее трансляцию. Наиболее существенным из таких факторов является белок Hfq, который может непосредственно связываться с мРНК *rpoS* и с малыми регуляторными РНК – DsrA, RprA, ArcZ, стимулируя трансляцию *rpoS*. Напротив, микро-РНК OxyS и нуклеоид-связывающий белок H-NS обладают репрессирующим эффектом (Zhang *et al.*, 1998; Hengge-Aronis, 2002; Hussein, Lim, 2011).

В экспоненциальной фазе роста концентрация σ^S поддерживается на низком уровне, поскольку большая часть синтезируемого белка RpoS подвергается расщеплению АТФ-зависимой протеазой ClpXP. При переходе в стационарную фазу или при стрессовых воздействиях устойчивость RpoS к протеолизу значительно возрастает. Для деградации σ^S необходим регуляторный белок RssB в фосфорилированной форме. Он специфически связывается с RpoS, что приводит к изменению пространственной структуры, благодаря чему σ^S становится доступной для ClpXP (Hengge, 2009, 2011). Существуют ингибиторы активности RssB – белки IraP, IraM и IraD, которые

при взаимодействии с RssB препятствуют деградации σ^S *in vivo* и *in vitro* (Hengge-Aronis, 2002; Battesti *et al.*, 2011).

Для того чтобы стать активной, σ^S должна ассоциировать с кор-ферментом РНК-полимеразы. У *E. coli* σ^S , как и другие альтернативные σ -субъединицы РНК-полимеразы, всегда присутствует в клетке в меньшем количестве, чем вегетативная σ^D (σ^{70}), при этом концентрация кор-фермента остаётся относительно постоянной. При переходе в стационарную фазу или при стрессовом воздействии, концентрация σ^S возрастает, что приводит к конкуренции между σ -субъединицами за связывание с кор-ферментом (Ishihama, 2000; Hengge, 2011). Ключевым регулятором этих процессов является гуанозинтетрафосфат, который снижает транскрипцию рРНК, активирует экспрессию альтернативных σ^S и σ^E , и воздействует на сигма-факторы, повышая их конкурентоспособность. Сродство σ^S к кор-ферменту возрастает в присутствии Crl-белка (Pratt, Silhavy, 1998). Формирование альтернативных холоферментов также обеспечивается экспрессией Rsd, который связывает значительную часть вегетативной σ^{70} , препятствуя ее участию в образовании холофермента (Hengge, 2011). При переходе клеток в стационарную фазу, малая консервативная 6S РНК блокирует фракцию холофермента $E\sigma^{70}$, приводя его в неактивную форму (Wassarman, Storz, 2000).

Показано, что в отсутствие иных стрессов, чем лимитация питательными компонентами, центральную роль в регуляции RpoS играет удельная скорость роста бактерий (μ) (Ihssen, Egli, 2004). Существует высокая обратная корреляция между значением μ и уровнем RpoS в клетке независимо от фактора, ингибирующего рост. Вероятным внутриклеточным сигналом, связывающим RpoS и μ , является (p)ppGpp, уровень которого обратно пропорционален удельной скорости роста (Potrykus *et al.*, 2011).

2.3. SOS-ответ

Воздействие на бактерии различных ДНК-повреждающих агентов, таких как АФК, УФ-излучение, антибиотики и т.д., приводит к индукции SOS-

ответа, который направлен на защиту клеток и репарацию генетических повреждений (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000). SOS-ответ активирует экспрессию более 50 генов, находящихся под транскрипционным контролем регуляторных белков LexA и RecA (Simmons *et al.*, 2008).

При нормальном росте бактерий белок RecA неактивен, а репрессор LexA связан со специфическими последовательностями ДНК (SOS-боксы) в промоторных областях SOS-генов и ингибирует их экспрессию. Активация RecA происходит в результате его АТФ-зависимого связывания с поврежденной ДНК в области одноцепочечных разрывов (ssDNA) с образованием RecA-ssDNA нуклеопротеиновых филаментов. Активированный RecA выступает как копротеаза, стимулируя ауторасщепление LexA, что инактивирует LexA как репрессор. В результате становится возможной экспрессия различных генов SOS-регулона, в том числе участвующих в репарации ДНК (включая мутагенез), рекомбинации и ингибировании клеточного деления (Little, 1996; Friedberg *et al.*, 2006).

Важной особенностью SOS-ответа является его «временной контроль»: время и уровень экспрессии индивидуальных SOS-генов варьируют в зависимости от степени сродства SOS-боксов к LexA, количества и расположения SOS-боксов, силы промотора и скорости аутопротеолиза репрессора (Little, 1983; Schnarr *et al.*, 1991; Kuzminov, 1999; Mustard, Little, 2000; Janion, 2008). На основании времени индукции гены SOS-регулона могут быть разделены на три группы. Первыми активируются гены, отвечающие за восстановление однонитевых разрывов (*uvrA*, *uvrB*, *uvrD*) и синтез ДНК-полимеразы II (*polB*), которая позволяет синтезировать ДНК в условиях блокады репликативных вилок, и ДНК-полимеразы IV (*dinB*). На этой стадии также индуцируется репрессор LexA и продукт гена *DinI*, который ингибирует синтез поврежденной ДНК. Если уровень активированного RecA не снижается из-за недостаточной скорости репарации однонитевых разрывов, происходит индукция более поздних генов. В частности, активируются гены рекомбинационной репарации *recA* и *recN*. Таким образом, RecA играет

значительную роль не только в индукции SOS-ответа, но и в рекомбинации и репарации одностранных и двустранных разрывов ДНК. Когда повреждения ДНК значительны, активируется экспрессия третьей группы генов, к которым относятся *sfiA(sulA)*, кодирующий ингибитор клеточного деления, *umuD* и *umuC*, кодирующие мутагенную ДНК-полимеразу V (мутасому), а также гены, кодирующие колицины и другие факторы, индукция которых ведет к лизису и гибели клеток (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kuzminov, 1999).

Накопление в клетках белка SulA ингибирует полимеризацию белка FtsZ, ответственного за формирование кольцевой структуры (Z-кольца) при делении клеток. Это приводит к прекращению процесса деления и вызывает филаментацию клеток (Witkin, 1967; Mizusawa, Gottesman, 1983; Simmons *et al.*, 2008). Предполагается, что ингибирование деления дает клетке время для осуществления репарации и предотвращает перенос поврежденной ДНК в дочерние клетки. Гидролиз SulA осуществляется с участием Lon-протеазы, кодируемой геном *lon*, который не входит в состав SOS-регулона.

Наряду с факторами, вызывающими прямое повреждение ДНК (УФ, АФК, антибиотики, токсины), индукторами SOS-ответа могут быть изменения физических параметров среды, такие как увеличение гидростатического давления или неоптимальные значения pH, эффект которых имеет косвенный характер. Высокое давление активирует эндонуклеазы рестрикции IV Mrr. Возникающие вследствие этого двустранные разрывы ДНК с помощью RecBCD преобразуются в классические сигналы для RecA-опосредованной SOS индукции. Изменения pH индуцируют SOS-ответ независимо от образования RecA-ssDNA нуклеопротеиновых филаментов, посредством влияния на ингибиторную способность репрессора LexA (Lovett, 2011).

SOS-регулон тесно связан с другими стрессовыми регулонами, такими как OxyR, SoxRS и RpoS (Imlay, Linn, 1987; Kato *et al.*, 1994) и играет важную роль в эволюции и патогенезе бактерий, способствуя возникновению новых генетических вариантов (SOS-мутагенез) и появлению фенотипически устойчивых форм (персистенция) (Dörr *et al.*, 2009; Lovett, 2011).

ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Модуляция активности стрессовых регулонов биологически активными соединениями может влиять на устойчивость бактерий к различным стрессовым факторам, в том числе к действию антибиотиков, и играть существенную роль при антибиотикотерапии.

По характеру воздействия на бактерии антибиотики подразделяют на бактериостатические (замедляют или останавливают рост, не вызывая гибели клеток) и бактерицидные (вызывают гибель клеток) (Wilson *et al.*, 2011). Антибиотики также разделяют на классы в зависимости от их химической природы и внутриклеточных мишеней, в качестве которых могут выступать рибосомы, ферменты, молекулы ДНК или РНК (Рисунок 10) (Страчунский, Козлов, 2002; Kohanski *et al.*, 2007, 2010).

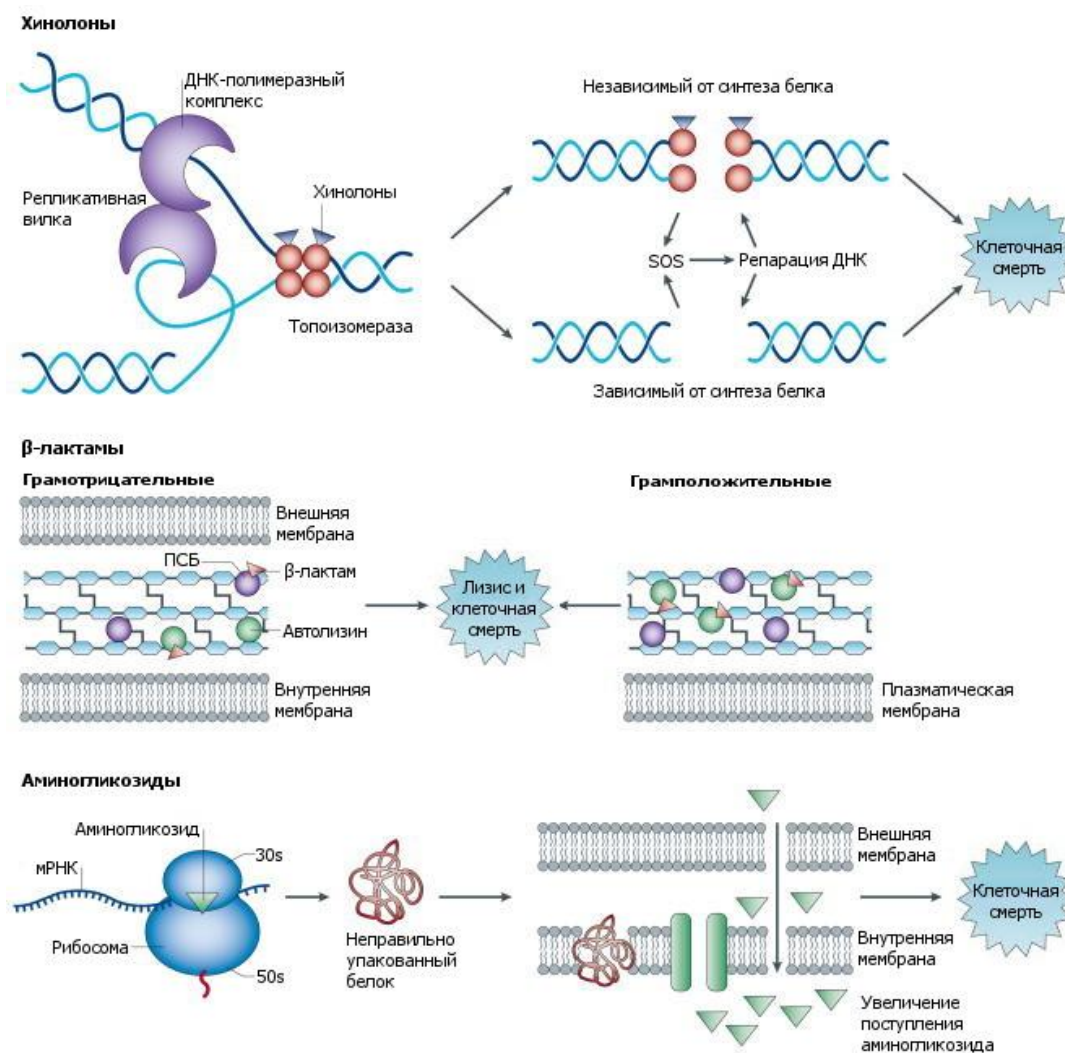


Рисунок 10. Взаимодействия «антибиотик-мишень» и связанные с ними механизмы клеточной смерти (Kohanski *et al.*, 2010).

3.1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки

β -лактамы – это первая из созданных и наиболее многочисленная и широко применяемая в современной химиотерапии группа бактерицидных антибиотиков (Алехин, 2000; Яковлев и Сидоренко, 1997). Характерной особенностью этой группы, куда входят пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы, является наличие в молекуле β -лактамного кольца (Страчунский, Козлов, 2002). В качестве мишени β -лактамов в микробной клетке служат транс- и карбоксипептидазы (пенициллинсвязывающие белки, ПСБ) – ферменты синтеза пептидогликана, основного компонента наружной мембраны микроорганизмов. Благодаря структурному сходству с компонентом пептидогликана D-аланил–D-аланином, бета-лактамное кольцо выступает в качестве аналога субстрата для ПСБ, связываясь с их активным центром и предотвращая нормальную сшивку пептидных цепей в пептидогликановом слое (Яковлев, Сидоренко, 1997; Zeng, Lin, 2013). Наличие клеточной стенки и интенсивное деление клеток является обязательным условием для бактерицидного действия данной группы антибиотиков (Алехин, 2000).

Гидрофобные антибиотики способны проникать прямо через липидный бислой мембраны. Однако большинство β -лактамов пересекают внешнюю мембрану грамотрицательных микроорганизмов через пориновые каналы, о чем свидетельствует увеличение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) таких антибиотиков у мутантов с низким содержанием поринов (Zimmermann, Rosselet, 1977; Hancock, Bell, 1988; Nikaido, 2003; Pagès *et al.*, 2008; Delcour, 2009; James *et al.*, 2009).

3.2. Ингибиторы синтеза белка

Аминогликозиды – группа эффективных бактерицидных антибиотиков, антимикробная активность которых обусловлена наличием одного или нескольких аминированных сахаров, соединенных гликозидной связью с агликоновым фрагментом (Фомина, 1997; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999;

Страчунский, Козлов, 2002; Желдакова, 2004; Becker, Cooper, 2013). Аминогликозиды нарушают синтез белка путем связывания с рибосомами бактериальной клетки. Связывание антибиотиков с 30S субъединицей препятствует образованию полипептидной цепи, ингибируя инициацию (эдеин и касугамицин) или подавляя элонгацию трансляции путем предотвращения либо транслокации тРНК в А-сайт (тетрациклины и стрептомицины), либо транслокации комплекса мРНК-тРНК через рибосому (гигромицин, неомицин, пактамицин и спектиномицин). Антибиотики, которые связываются с 50S субъединицей (макролиды), ингибируют образование полипептидной цепи, нарушая правильное расположение аминоацилированных концов тРНК в пептидил-трансферазном центре. Большинство макролидов не ингибируют образование пептидной связи, а скорее предотвращают удлинение растущих цепей, что приводит к отсоединению пептидил-тРНК и преждевременному прекращению трансляции (Kotra *et al.*, 2000; Wilson, 2014).

Прохождение аминогликозидов через наружную мембрану грамотрицательных бактерий представляет собой «самопродвигающийся» процесс, в ходе которого возникают разрывы Mg^{2+} -мостиков между смежными молекулами липополисахаридов, что способствует дальнейшему входу антибиотиков (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Kotra *et al.*, 2000; Желдакова, 2004). Последующий транспорт аминогликозидов через цитоплазматическую мембрану является энергозависимым и требует наличия трансмембранного градиента протонов. Ингибирование синтеза белка само по себе останавливает рост, но не приводит к гибели клеток. Бактерицидный эффект аминогликозидов связывают с накоплением поврежденных неправильно упакованных белков, которые встраиваются в цитоплазматическую мембрану и изменяют ее свойства, стимулируя вход антибиотиков с использованием энергии переноса электронов и гидролиза АТФ. Именно эта стадия летальна для чувствительных клеток (Желдакова, 2004; Becker, Cooper, 2013). Предполагают, что устойчивость анаэробов к действию аминогликозидов

связана с отсутствием у них мембранного потенциала и механизмов переноса электронов, необходимых для транспорта молекул антибиотика (Hancock, Bell, 1988; Желдакова, 2004; Becker, Cooper, 2013).

3.3. Ингибиторы репликации и транскрипции

Хинолоны и их фторпроизводные являются высокоэффективными синтетическими антибиотиками с широким спектром антибактериального действия (Страчунский, Козлов, 2002; Drlica *et al.*, 2008; Aldred *et al.*, 2014). Внутриклеточными мишенями хинолонов являются две бактериальные топоизомеразы: ДНК-гираза и ДНК-топоизомераза IV. ДНК-гираза служит основной мишенью у грамотрицательных, а топоизомераза IV – у грамположительных бактерий. Топоизомеразы играют важную роль в процессе репликации, релаксируя сверхспирализованные молекулы ДНК посредством внесения одно- или двуцепочечных разрывов с последующим их восстановлением (лигированием). Хинолоны быстро связываются с комплексом ДНК-фермент в так называемом «хинолоновом кармане», препятствуя восстановлению разрывов в молекуле ДНК (Hawkey, 2003; Drlica *et al.*, 2008; Fàbrega *et al.*, 2009; Aldred *et al.*, 2014). Образование тройных комплексов блокируют репликацию ДНК и рост клеток, но не обладает летальным действием. Второй, бактерицидный этап связан с фрагментацией хромосом, которая осуществляется двумя путями, один из которых зависит от АФК и блокируется хлорамфениколом и анаэробнозом, а второй не зависит от АФК и синтеза белка. Хинолоны первого поколения (налидиксовая кислота) используют хлорамфеникол-зависимый путь летального действия, в то время как современные фторхинолоны работают в основном по второму пути (Malik *et al.*, 2006; Redgrave *et al.*, 2014). Полученные в результате действия хинолонов разрывы ДНК индуцируют SOS-ответ и филаментацию клеток. Если репаративные процессы не справляются с повреждениями, наступают необратимые нарушения деления, глубокие структурные изменения и в итоге

гибель клеток (Smith, Lewin, 1988; Желдакова, 2004; Drlica *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009).

Существует несколько способов проникновения хинолонов через клеточную стенку грамотрицательных бактерий. Гидрофильные хинолоны, по-видимому, могут проходить через пориновые каналы. Более гидрофобные соединения проникают путем диффузии через липидный бислой мембраны. Третий способ, так называемый «самопродвигающий транспорт», аналогичен транспорту аминогликозидов. Способ транспорта зависит от гидрофобности, размера и структуры молекулы антибиотика (Nikaido, Vaara, 1985; Piddock, Wise, 1986; Hirai *et al.*, 1986; Chapman, Georgopapadakou, 1988; Bryan, Bedard, 1991; Pagès *et al.*, 2008; Delcour, 2009).

3.4. Оксидантный механизм бактерицидного действия антибиотиков и программируемая клеточная смерть

Несмотря на многочисленные исследования, полное понимание механизмов летального действия антибиотиков разных классов и бактериальных адаптивных механизмов, ответственных за формирование фенотипической устойчивости к антибиотикам (толерантности), до сих пор отсутствует. Изучение этих процессов особенно усилилось в последнее десятилетие в связи с ускоренным ростом количества антибиотико-резистентных штаммов и поиском внутриклеточных мишеней для создания новых антимикробных препаратов. Оживленную дискуссию вызвала гипотеза, предполагающая, что единым механизмом гибели клеток при действии антибиотиков с различными внутриклеточными мишенями является окислительный стресс (Kohanski *et al.*, 2007). Согласно этой гипотезе, наряду с воздействием на специфические мишени клеток, антибиотики вызывают глубокие изменения центрального метаболизма, в том числе дыхания и баланса ионов железа. Ускорение дыхания сопровождается повышением продукции супероксида и перекиси водорода и разрушением Fe-S кластеров, что приводит к образованию токсичных гидроксильных радикалов в ходе

реакции Фентона, окислительному повреждению и гибели клеток (Рисунок 11) (Kohanski *et al.*, 2007; Dwyer *et al.*, 2007; Dwyer *et al.*, 2015).

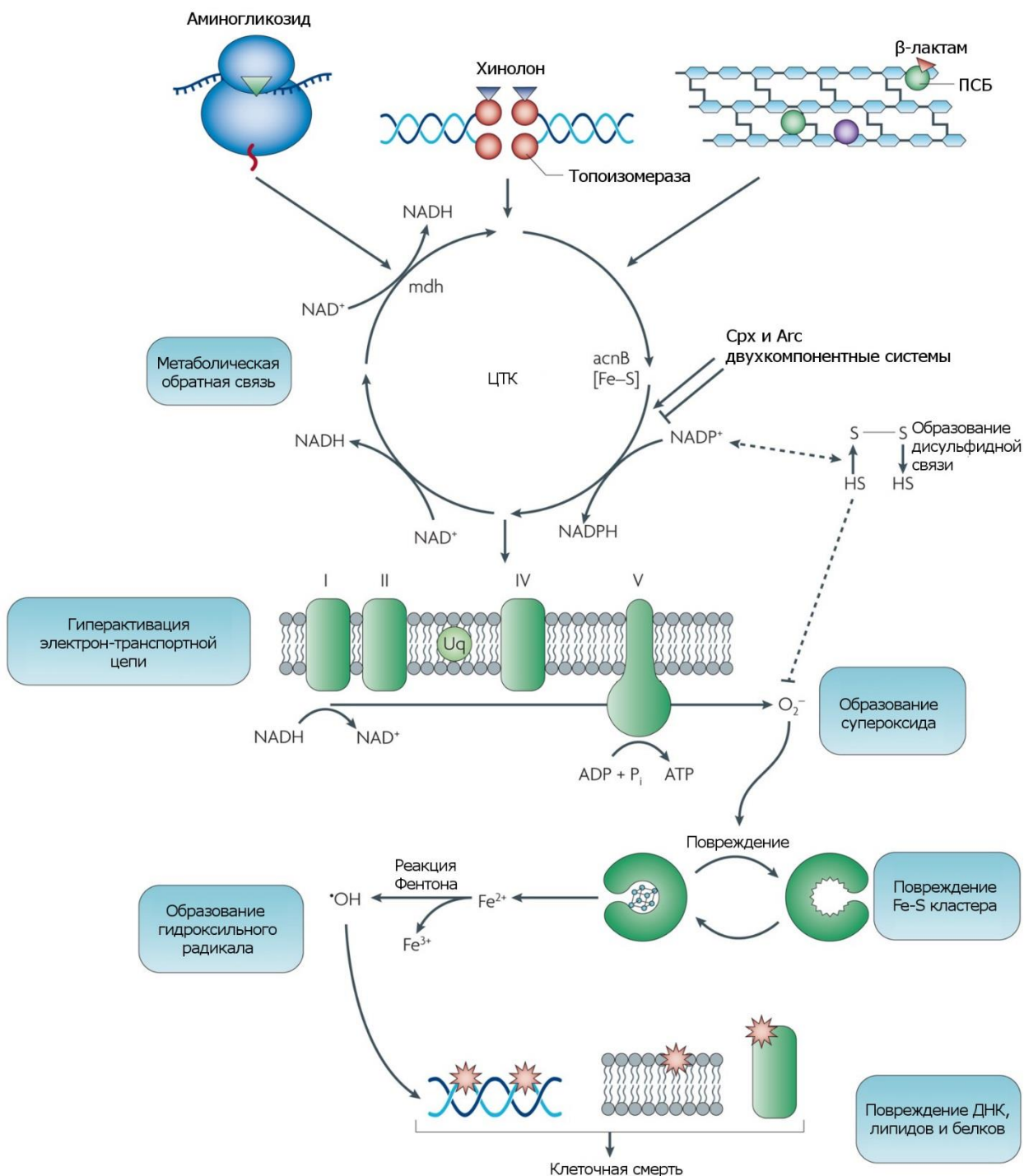


Рисунок 11. Общий механизм гибели клеток, индуцированный бактерицидными антибиотиками (Kohanski *et al.*, 2010).

В пользу гипотезы приводятся данные, что антибиотики разных классов вызывают повышение продукции АФК, дисбаланс железа, изменение редокс-статуса и индукцию антиоксидантных генов (Becerra, Albesa, 2002; Albesa *et*

al., 2004; Becerra *et al.*, 2006; Goswami *et al.*, 2006, 2007; Dwyer *et al.*, 2007; 2009; Kohanski *et al.*, 2008; Kolodkin-Gal *et al.*, 2008; Wang, Zhao, 2009; Aiassa *et al.*, 2012; Lobritz *et al.*, 2015). Кроме того, показано, что в делеционных мутантах по антиоксидантным генам *katG*, *katE*, *sodC* и *ahpC* повышается чувствительность к фторхинолонам, аминогликозидам и β -лактамам (Goswami *et al.*, 2006; Wang, Zhao, 2009), а предобработка низкими дозами агентов, генерирующих супероксид, обеспечивает защиту от последующего воздействия этих антибиотиков (Mosel *et al.*, 2013). Хелатор железа дипиридил, а также антиоксиданты тиомочевина, аскорбиновая кислота и глутатион повышают устойчивость бактерий к действию ряда антибиотиков (Goswami *et al.*, 2006, 2007; Kohanski *et al.*, 2007; Dwyer *et al.*, 2014). В то же время показано, что глутатион усиливает чувствительность к β -лактамам (Goswami, Jawali, 2007) и повышает бактерицидную активность ципрофлоксацина и гентамицина в отношении устойчивого к этим антибиотикам штамма *S. aureus* (Páez *et al.*, 2010). Большой интерес к гипотезе вызван возможностью усиления бактерицидной активности антибиотиков путем воздействий, повышающих уровень АФК.

Однако ряд исследователей выступили против этой гипотезы, утверждая, что бактерицидный эффект антибиотиков осуществляется специфическими механизмами и не зависит от образования АФК (Liu, Imlay, 2013; Keren *et al.*, 2013; Ezraty *et al.*, 2013). Отмечается, что данные по усилению продукции АФК при действии бактерицидных антибиотиков должны быть пересмотрены с учетом изменений аутофлуоресценции, вызванных изменением клеточной морфологии (Renggli *et al.*, 2013). Показано, что бактерицидные антибиотики проявляют летальный эффект в анаэробных условиях, не способствуют образованию H_2O_2 и не вызывают индукцию OxyR-контролируемых генов (Liu, Imlay, 2013; Keren *et al.*, 2013). Кластеры Fe-S, необходимые для продукции АФК, играют существенную роль в гибели клеток только в случае аминогликозидов, поскольку они способствуют поглощению этих антибиотиков (Ezraty *et al.*, 2013). Антиоксиданты могут

повышать устойчивость к антибиотикам не благодаря снижению уровня радикалов, а путем замедления метаболизма и снижения скорости роста бактерий (Smirnova *et al.*, 2016). В целом, очевидно, что характер и роль изменений редокс-статуса клеток при действии антибиотиков требуют дальнейших исследований.

Определенная общность физиолого-биохимических изменений в бактериальных клетках при действии антибиотиков с разными мишенями может быть связана с индукцией общих механизмов ответа на стрессы. Показано, что вызванная антибиотиками гибель бактериальных клеток опосредуется SOS-системой, имеет признаки программируемой клеточной смерти у многоклеточных организмов – апоптоза и может рассматриваться как экстремальный SOS-ответ (Dwyer *et al.*, 2012; Erental *et al.*, 2014). Наряду с хинолонами и другими ДНК-повреждающими агентами, SOS-ответ индуцируют аминогликозиды и β -лактамы (Lewin, Amyes, 1991; Miller *et al.*, 2004; Kohanski *et al.*, 2007; Drlica *et al.*, 2008). К числу маркеров SOS-опосредованной клеточной смерти относятся конденсация хромосом, фрагментация ДНК, деградация рРНК, падение мембранного потенциала. Все эти процессы могут осуществляться при участии SOS-контролируемых токсин-антитоксиновых систем *symE*, *tisB*, *dinQ* и других (Dörr *et al.*, 2009; 2010). Такой экстремальный стрессовый ответ приводит к полной остановке метаболических процессов и переходу в так называемое дормантное состояние, которое является источником появления персисторов, клеток, способных образовывать колонии после прекращения действия антибиотика. В результате, одновременно с гибелью поврежденных клеток достигается выживание неповрежденной фракции популяции. Образование персисторов, обеспечивающих повышение толерантности бактерий к различным антибиотикам, опосредуется также другими токсин-антитоксиновыми системами, которые контролируются ppGpp (Maisonneuve, Gerdes, 2014). С этой точки зрения не удивительно, что различные стрессовые воздействия (лимитация питательными компонентами, окислительный стресс,

повреждение клеточных оболочек и другие стрессы, влияющие на рост) приводят к протекторным изменениям клеточной физиологии, которые связаны с развитием устойчивости к антибиотикам (Poole, 2012).

Подводя итог обзора литературы, можно сделать следующие выводы:

1. Полифенолы и фитоэкдистероиды оказывают положительное влияние на здоровье человека. Механизм этого влияния недостаточно изучен и может быть отчасти опосредован их воздействием на микробиоту кишечника.
2. Механизм воздействия полифенолов и экдистероидов на клеточные культуры млекопитающих и клетки бактерий связан с антирадикальными, хелатирующими и прооксидантными (в случае полифенолов) свойствами этих соединений.
3. Оба типа биологически активных соединений способны воздействовать на сигнальные пути клеток и индуцировать экспрессию стрессовых регулонов. Однако данные в этой области исследований ограничены, а в случае бактерий представлены в единичных работах.
4. Модуляция стрессовых регулонов бактериальных клеток может изменять их толерантность к антибиотикам. Способность полифенолов и экдистероидов участвовать в этом процессе изучена в недостаточной степени. Дальнейшие исследования позволят открыть новые перспективы для разработки методов повышения эффективности антибиотикотерапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Объекты исследования

Использованные в настоящей работе штаммы *Escherichia coli* с указанием их генотипических свойств и источника получения представлены в таблице 3. Штаммы NM3001 и NM3011, несущие слияния промоторов *sodA* и *sulA(sfiA)* генов с геном *lacZ*, были сконструированы путем трансдукции фагом PI соответствующих слияний из *E. coli* QC772 и DM4000 в BW25113 (Carlioz, Touati, 1986; Volkert *et al.*, 1989). Штаммы NM3021, NM3031 и NM3041, несущие слияния генов *katG*, *katE* и *rpoS(katF)* с геном *lacZ*, были получены путем трансформации клеток *E. coli* BW25113 плазмидами pKT1033, pRS KatE16 и pRS 415 KatF5 соответственно (Tao *et al.*, 1989; Mulvey *et al.*, 1990).

Таблица 3. Штаммы *E. coli* и плазмиды, используемые в работе.

Штамм / плазида	Генотип	Источник
BW25113	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Coli Genetic Stock Center (CGSC)
DM4000	<i>hisG4 argE3 thr-1⁻ ara-14 xyl-5 mtl-1 rpsL31 tsx-33 ilv TS sulA::Mud1(bla lac) cam</i>	проф. М. Volkert
NM3001	как BW25113, но <i>sodA::lacZ</i>	Музей ЛФГМ
NM3011	как BW25113, но <i>sul(sfiA)A::lacZ</i>	Музей ЛФГМ
NM3021	как BW25113, но <i>katG::lacZ</i>	Музей ЛФГМ
NM3031	как BW25113, но <i>katE::lacZ</i>	Музей ЛФГМ
NM3041	как BW25113, но <i>rpoS(katF)::lacZ</i>	Музей ЛФГМ
QC772	F ⁻ , Δ(<i>argF-lac</i>)169, λ ⁻ , IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1, <i>rpsL</i> 179(<i>strR</i>), <i>sodA</i> 49(<i>sodA'</i> - ' <i>lacZ</i>)	проф. D. Touati
pKT1033		проф. К. Tao
pRS KatE16		проф. М. Volkert
pRS 415 KatF5		проф. А. Eisenstark

4.2. Питательные среды и условия культивирования

Бактерии выращивали на минимальной среде M9 (Na₂HPO₄·12H₂O – 15.13 г/л; KH₂PO₄ – 3 г/л; NH₄Cl – 1 г/л; NaCl – 0.5 г/л; MgSO₄·7H₂O – 0.246 г/л; CaCl₂ – 0.011 г/л) (Miller, 1972) с добавлением 0.15% глюкозы, 0.2% казаминовых кислот и тиамина (10 мкг/мл). Селективный отбор бактерий,

несущих определенный набор мутаций, осуществляли с помощью антибиотиков, к которым устойчив исследуемый штамм.

Клетки из ночной культуры центрифугировали и переносили в колбы объемом 250 мл, содержащие 100 мл среды М9, до начальной оптической плотности (optical density) при длине волны 600 нм $OD_{600} = 0.1$ и выращивали в термостатируемом орбитальном шейкере при скорости вращения 150 об/мин и температуре 37°C до $OD_{600} = 0.3$. Оптическую плотность измеряли на фотометре КФК-3-01 («ЗОМЗ», Россия) при длине светового пути кюветы 5 мм.

4.3. Определение удельной скорости роста

Удельную скорость роста культуры (μ , час⁻¹) определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln OD_{600}(t_2) - \ln OD_{600}(t_1)}{t_2 - t_1}$$

где $OD_{600}(t_2)$ и $OD_{600}(t_1)$ – оптическая плотность культуры, измеренная при длине волны 600 нм, во время t_2 и t_1 .

4.4. Определение влияния экстрактов на чувствительность *E. coli* к H₂O₂ и антибиотикам

Культуру в экспоненциальной фазе роста центрифугировали и ресуспендировали в 8 мл среды М9. В ячейки планшета добавляли по 5 мкл исследуемых экстрактов, 5 мкл концентрированных клеток и среду М9 до общего объема 200 мкл. Планшеты инкубировали на термошейкере ELMi Ltd Sky Line ST-3L (Латвия) при 150 об/мин и температуре 37°C 20 мин, измеряли оптическую плотность и в опытные ячейки вносили H₂O₂ или антибиотики ципрофлоксацин, канамицин, стрептомицин и цефотаксим, и в течение 70 мин следили за ростом по изменению OD_{600} . Оптическую плотность измеряли на микропланшетном спектрофотометре BioRad xMark™ (США) с общим объемом в ячейке 200 мкл.

Индекс антиоксидантной активности рассчитывали как отношение удельной скорости роста бактерий, предобработанных экстрактами, к удельной скорости роста без предобработки через 30 мин после добавления H_2O_2 :

$$\text{Индекс АОА} = \frac{\mu_2 \text{ экстракта} \times \mu_1 \text{ контроля}}{\mu_1 \text{ экстракта} \times \mu_2 \text{ контроля}}$$

где μ_1 и μ_2 – удельная скорость роста бактерий до и после добавления H_2O_2 соответственно.

4.5. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антибиотиков

МИК определяли в иммунологических планшетах методом серийных разведений на минимальной среде М9 с добавлением 0.15% глюкозы и 0.2% казаминовых кислот. В лунки планшета вносили среду с последовательными двукратными разведениями испытуемого антибиотика и по 50 мкл суспензии клеток с $OD_{600} = 0.003$ до общего объема в лунке 100 мкл. Затем измеряли оптическую плотность и планшеты помещали в термостат при $37^\circ C$ на 22 часа, после чего снова измеряли OD_{600} . МИК определяли как самую низкую концентрацию антибиотика, которая полностью подавляет рост бактерий.

4.6. Колониеобразующая способность

Способность бактерий к формированию колоний определяли в образцах из контрольной и опытной культур, отобранных через определенные временные промежутки (0, 30, 70 мин) после воздействия антибиотиков. Пробы разводили 0.9% NaCl, капли полученной суспензии (10 мкл) из разных разведений помещали на чашки с 1.5% LB-агаром и инкубировали в термостате при $37^\circ C$. Количество образовавшихся колоний (КОЕ) подсчитывали через 24 часа инкубации.

4.7. Определение активности β -галактозидазы

Активность β -галактозидазы в клетках *E. coli*, несущих слияния гена *lacZ* с промоторами исследуемых генов, определяли по методу Миллера (Miller, 1972), модифицированному для иммунологических планшетов (Smirnova *et al.*, 2012). 30 мкл культуры из каждой ячейки первого планшета, где осуществляли выращивание и обработку культуры H_2O_2 или антибиотиками, переносили во второй планшет с 90 мкл восстановительного буфера, содержащего 0.1 М $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (pH 7), 10 мМ KCl, 1 мМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 мМ $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 50 мМ меркаптоэтанола и 50 мкг/мл хлорамфеникола. Затем добавляли по 1 мкл 1% дезоксихолата натрия и толуола и инкубировали 30 мин при температуре 37°C и 150 об/мин. После чего добавляли 30 мкл 13.3 мМ *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозида (ОНФГ), инкубировали 1 час и останавливали реакцию добавлением 30 мкл 1N K_2CO_3 . Каждое измерение дублировали контролем без ОНФГ (вместо которого добавляли 30 мкл восстановительного буфера). Поглощение измеряли при длине волны 420 нм, соответствующей суммарному поглощению окрашенного продукта реакции *o*-нитрофенола и рассеянию света обломками клеток, и на длине волны 550 нм, когда присутствует только рассеяние света обломками клеток. Используя поправочный коэффициент рассеяния, равный $1.75 \times OD_{550}$, вычисляли истинное поглощение *o*-нитрофенола. Активность β -галактозидазы выражали в относительных единицах Миллера и рассчитывали по формуле:

$$\text{Активность, ед. Миллера} = 100 \times \frac{OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}}{OD_{600}},$$

где OD_{420} и OD_{550} – измеренные значения для реакционной смеси; OD_{600} – плотность клеточной суспензии перед определением; t – время реакции в минутах, 100 – коэффициент, учитывающий продолжительность экспозиции с ОНФГ и разведение исходной культуры.

4.8. Получение экстрактов растений

Экстракты пажитника сеного *Trigonella foenum-graecum*, серпухи венценосной *Serratula coronata* L. и готовый препарат Серпистен были предоставлены сотрудниками лаборатории биохимии растений и биотехнологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Серпистен получен из надземных частей серпухи венценосной и представляет собой смесь в соотношении 8:1 экдистероидов 20-гидроксиэкдизона (20E) и инокостерона (In), являющегося структурным изомером 20E. Экстракты пажитника и серпухи готовили из 0.5 кг сухого сырья, экстрагировали 6.5 л воды и высушивали при помощи распылительной сушки. Из сухих субстанций готовили исходный раствор в ДМСО (концентрация экстрактов 16.7 мг/мл, серпистена – 3.3 мг/мл). Конечная концентрация экстрактов в экспериментах с бактериями составляла 0.42 мг/мл, серпистена – 0.08 мг/мл.

Красное виноградное вино «PRIOS» (Испания) упаривали на ротаторном испарителе IKA RV10 (Германия) и лиофильно высушивали. Сухую кожуцу красного винограда (10 г) размалывали и экстрагировали 3 раза по 30 мин раствором этиловый спирт : вода в соотношении 4:1 (v/v) на ультразвуковой водяной бане (Elmasonic S10 H, Elma, 37 kHz, 30 W, Германия) при температуре 60°C. Объединенный экстракт упаривали на ротаторном испарителе и лиофильно высушивали. Для экспериментов с бактериями готовили исходный раствор высушенного вина и экстракта виноградной кожуцы в ДМСО с концентрациями 142 мг/мл и 152 мг/мл соответственно. Конечная концентрация экстракта вина и кожуцы в экспериментах с бактериями составляла 3.6 мг/мл и 3.8 мг/мл соответственно.

4.9. Общее содержание полифенолов в экстрактах

Общее содержание полифенолов в экстрактах измеряли модифицированным методом Folin-Ciocalteu (Wu *et al.*, 2006). Экстракты (10 мкл) смешивали с 40 мкл реагента Folin-Ciocalteu, встряхивали в течение 15 сек и инкубировали 3 мин при комнатной температуре. Затем добавляли

100 мкл 7% Na₂CO₃, и смесь доводили деионизированной водой до 3 мл. Через 90 мин инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение при 760 нм, используя спектрофотометр Bio-Rad SmartSpec Plus (США). Полученные значения сравнивали со стандартной кривой, построенной для растворов галловой кислоты, и выражали в эквивалентах галловой кислоты (мг GAE/г сухого экстракта).

4.10. Содержание отдельных полифенолов и экидистероидов в экстрактах

Содержание отдельных полифенолов и экидистероидов в экстрактах определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20AD (Япония). Разделение проводили на колонке SUPELCOSIL™ C18 (250×4.6 мм, диаметр частиц – 5 мкм, матрица – силикагель). При исследовании использовали растворители: А – ацетонитрил; В – смесь бидистиллированной воды и уксусной кислоты в соотношении 40:1. Скорость потока – 1 мл/мин, объём вводимой пробы – 20 мкл. Режим подачи растворителей: 0-15 мин, А – 14%, В – 86%; 16-45 мин, А – 35%, В – 65%; 46-48 мин, А – 100%. Анализ пиков осуществляли при длинах волн 220-400 нм.

4.11. Определение хелатирующей активности

Способность экстрактов и полифенолов хелатировать ионы Fe²⁺ определяли модифицированным методом (Kim *et al.*, 2005). Реакционную смесь, содержащую 50 мкл образца и 10 мкл 1 мМ FeSO₄, активировали добавлением 6.7 мкл 5 мМ феррозина в ацетатном буфере. Раствор перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, после чего определяли поглощение при длине волны 562 нм, используя спектрофотометр Bio-Rad SmartSpec Plus. Хелатирующую активность рассчитывали, используя уравнение:

$$\text{Хелатирующий эффект, \%} = \frac{OD_{562 \text{ контроля}} - OD_{562 \text{ образца}}}{OD_{562 \text{ контроля}}} \times 100$$

График зависимости хелатирующего эффекта от концентрации исследуемого образца использовали для расчета EC_{50} , как концентрации, при которой ионы Fe^{2+} связываются на 50%.

4.12. Определение радикалсвязывающей активности (РСА)

Антирадикальную активность образца определяли по его способности связывать стабильные радикалы 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила ($DPPH^{\bullet}$) (Shyur *et al.*, 2005). Определение проводили в реакционной смеси, содержащей 3 мл 0.3 мМ этанольного раствора $DPPH^{\bullet}$, 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 7.4) и 5-20 мкл экстракта. После 30 минут инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение при 517 нм на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec Plus. Ингибирующий эффект на уровень $DPPH^{\bullet}$ рассчитывали согласно формуле:

$$\text{Ингибирующий эффект, \%} = \frac{OD_{517} \text{ контроля} - OD_{517} \text{ образца}}{OD_{517} \text{ контроля}} \times 100$$

Строили график зависимости ингибирующего эффекта от концентрации исследуемых соединений и определяли величину IC_{50} , как концентрацию, при которой связывается 50% свободных радикалов $DPPH^{\bullet}$.

4.13. Измерение скорости продукции H_2O_2 препаратами

Концентрацию H_2O_2 определяли спектрофлуориметрическим методом с красителем Amplex Red (AR) и пероксидазой хрена (HRP) (Seaver, Imlay, 2001). 5 мкл образца вносили в 50 мМ фосфатный буфер (pH 7.8) и инкубировали на термостатируемом шейкере при 37°C в течение 30 мин. 1.35 мл полученной пробы инкубировали с 0.75 мл флуорофора Amplex Red (200 мкМ) и 0.75 мл HRP (0.02 мг/мл) в течение 5 мин. Содержание H_2O_2 в образцах измеряли на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (Япония) при длине волны облучения 563 нм и эмиссии – 587 нм через 0 и 30 мин с начала инкубации. Для расчета концентрации использовали калибровочный график, построенный с использованием стандартных растворов H_2O_2 .

4.14. Измерение парциального давления кислорода

Определение парциального давления кислорода (pO_2) в среде культивирования проводили полярографическим методом с использованием электрода Кларка InPro 6800 (Mettler Toledo, Швейцария) и комплекта измерительной аппаратуры NBS «BioFlo 110» (Германия). Значения pO_2 выражали в % от максимального насыщения, которое определялось в среде без клеток.

4.15. Определение экстраклеточного K^+

Изменение уровня экстраклеточного K^+ непрерывно регистрировалось непосредственно в колбах с использованием системы K^+ -селективных (ELIS-121K) и эталонных электродов и компьютерного рН-метра/иономера срХ-2 (Пушино, Россия). Для измерений K^+ клетки *E. coli* выращивали на низкокалиевой (0.1 мМ) среде M9.

4.16. Изучение изменений мембранного потенциала

Для выявления изменений мембранного потенциала использовали проникающий флуоресцентный краситель DiBAC ($[DiBAC_4(3)]$, бис-(1.3-дибутилбарбитуратовая кислота-триметиноксонол), относящийся к категории медленных флуорохромов (Wickens *et al.*, 2000). $DiBAC_4(3)$ растворяли в 70% этаноле до концентрации 1 мг/мл, а затем в деионизированной воде до конечной концентрации 100 мкг/мл.

Бактериальную культуру (180 мкл) смешивали с 20 мкл раствора $DiBAC_4(3)$ с концентрацией 100 мкг/мл (финальная концентрация красителя в реакционной смеси 10 мкг/мл) и оставляли в темноте при 37°C в течение 10 мин, после чего готовили микропрепарат. Для этого 10 мкл образца наносили на предметное стекло с 1%-ной агарозой (приготовленной на среде M9) и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM2000 (фильтр-система I3, возбуждение – λ 450-490 нм, эмиссия – λ 515 нм). Общее

количество клеток подсчитывали в проходящем свете на определенной площади с помощью программного пакета Leica Application Suite (v.3.4.0). Для каждого образца в сумме подсчитывали не менее 1000 клеток в трех независимых экспериментах.

4.17. Статистическая обработка результатов

Обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Office 2013, версия 15.0.4745.1000) и Statistica 6.0, вычисляя среднее значение и стандартную ошибку среднего. Каждый результат показан как среднее значение из не менее трех независимых экспериментов $\pm$ стандартная ошибка среднего. Достоверность различий между средними величинами оценивали согласно критерию Стьюдента (t), различия считались значимыми при уровне значимости $p < 0.05$. Для исследования связи двух признаков вычисляли коэффициент корреляции Пирсона при уровне значимости $p = 0.05$. В таблицах и графиках достоверно различающиеся величины обозначены символом *.

4.18. Материалы

Использованные в работе реагенты: казаминовые кислоты, тиамин, ОНФГ, меркаптоэтанол, дезоксихолат натрия, LB, агар, Amplex Red, DiBAC₄(3), horseradish peroxidase, 2,2'-дипиридил, тролокс, 20-гидроксиэкдизон, транс-ресвератрол, ДМСО, ацетонитрил получены от Sigma Chemical Co и ICN Biomedicals, Inc. (США), Трансверол® производства компании «Экомир» (Россия). Остальные реагенты, использованные для приготовления растворов и сред, были отечественного производства, классифицируемые как х.ч.

ГЛАВА 5. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИФЕНОЛЫ И ЭКДИСТЕРОИДЫ, И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ СТРЕССОВЫХ РЕГУЛОНОВ *ESCHERICHIA COLI*

Согласно литературным данным, в основе антиоксидантного действия и влияния полифенолов и экдистероидов на устойчивость клеточных культур млекопитающих и бактерий к стрессовым факторам может лежать способность этих соединений к связыванию радикалов и редокс-активных металлов, а также их модулирующее действие на редокс-статус клеток и активность стрессовых регулонов (López-Alarcón, Denicola, 2013). В соответствии с задачами наших исследований мы провели сравнительное изучение этих свойств у двух групп биологически активных субстанций с хорошо известными положительными эффектами на здоровье человека и проанализировали их влияние на устойчивость бактерий *E. coli* к перекиси водорода и антибиотикам разных классов. Первая группа препаратов включает известные высокоактивные антиоксиданты полифенольной природы: кверцетин (флавонол), ресвератрол (стильбен), биологически активную добавку «Трансверол» (Россия), состоящую из ресвератрола и кверцетина в соотношении 1:3.3, а также красное виноградное вино и экстракт кожицы красного винограда, являющиеся богатыми пищевыми источниками полифенолов. Вторая группа представлена экдистероидсодержащими препаратами: 20-гидроксиэкдизоном (20E), биологически активной добавкой «Серпистен», содержащей смесь экдистероидов 20E и 25S-инокостерона в соотношении 8:1, а также экстрактами серпухи венценосной (*Serratula coronata*) и пажитника сенного (*Trigonella foenum-graecum*). Биологические эффекты исследуемых соединений сравнивались с воздействием антиоксиданта тролокса (водорастворимый аналог витамина E) и хелатора Fe^{2+} дипиридила.

5.1. Изучение свойств исследуемых препаратов с использованием химических тестов

5.1.1. Содержание полифенолов и экдистероидов в исследуемых препаратах

Результаты определения суммарного содержания фенольных соединений в исследуемых препаратах представлены в таблице 4. В наших условиях наибольший уровень полифенолов был обнаружен в биодобавке «Трансверол», наименьший – в биодобавке «Серпистен». Содержание полифенолов в экстрактах значительно различалось, снижаясь в следующем порядке: вино > кожица винограда > пажитник > серпуха. При этом содержание полифенолов в экстракте кожицы было в 2 раза ниже, в экстракте пажитника в 3.4 раза ниже, а в экстракте серпухи в 7.7 раз ниже, чем в вине.

Таблица 4. Суммарное содержание фенольных соединений в препаратах.

Исследуемый препарат	Полифенолы, мг(GAE)/г сух. веса
Экстракт вина	111.4 ± 2.1
Экстракт кожицы винограда	53.6 ± 1.1
Трансверол	387.9 ± 2.8
Экстракт серпухи	14.4 ± 0.4
Экстракт пажитника	32.6 ± 0.2
Серпистен	2.9 ± 1.5

Полученные результаты сопоставимы и хорошо согласуются с опубликованными ранее данными о содержании полифенолов в исследуемых экстрактах (Anilakumar *et al.*, 2007; Anastasiadi *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2010; Rockenbach *et al.*, 2011).

Изучение содержания отдельных полифенолов и экдистероидов в составе образцов осуществлялось методом ВЭЖХ. Исследования показали, что вино и виноградная кожица содержали примерно одинаковое количество ресвератрола (81.5 и 75.9 мкг/г сух. веса соответственно), но существенно отличались по уровню кверцетина, которого в экстракте кожицы было в 2 раза больше, чем в экстракте красного вина (55.1 и 115.6 мкг/г сух. веса соответственно). Полученные данные о соотношении ресвератрола и

кверцетина в вине и экстракте винограда соответствуют результатам, опубликованным ранее (Van Leeuw *et al.*, 2014). Помимо ресвератрола и кверцетина, в экстрактах были обнаружены другие фенольные соединения: галловая и кофейная кислоты, а также эпигаллокатехин галлат и танин (Рисунок 12).

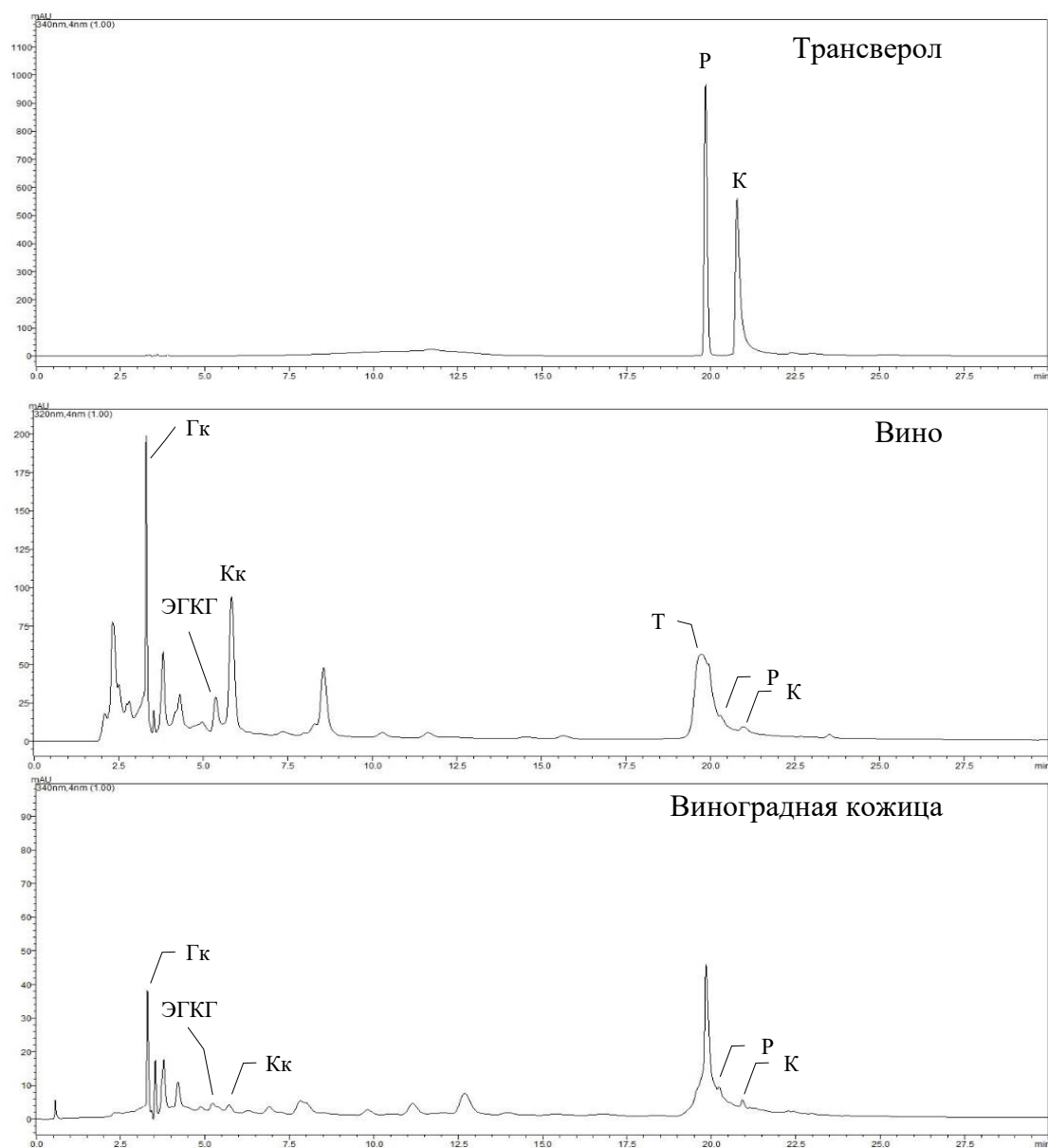


Рисунок 12. ВЭЖХ-хроматограммы изучаемых субстанций.

(Гк – галловая кислота, К – кверцетин, Кк – кофейная кислота, Р – ресвератрол, Т – танин, ЭГКГ – эпигаллокатехин галлат).

Серпистен и экстракт серпухи отличались наибольшим разнообразием и количеством экидистероидов (Рисунок 13).

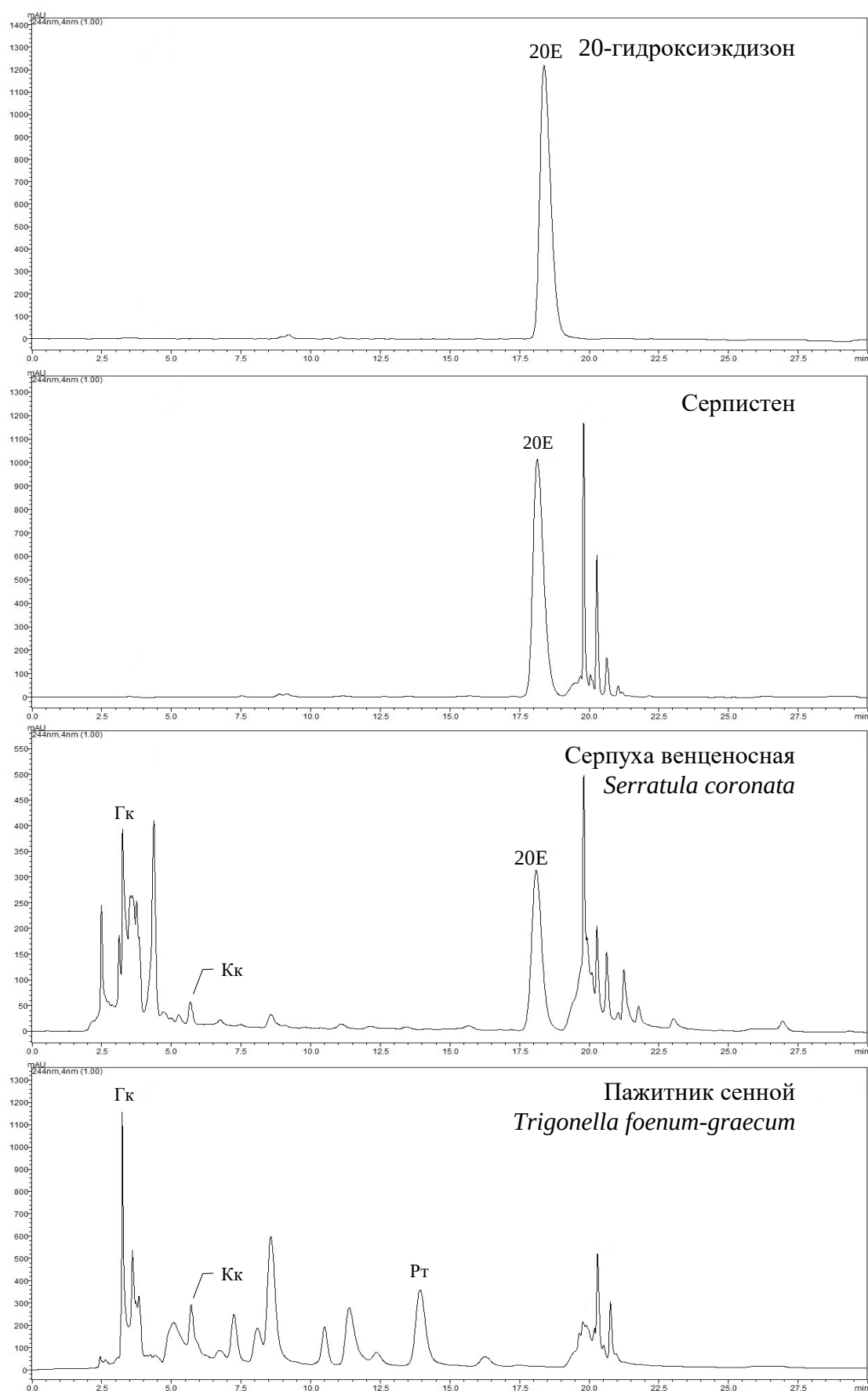


Рисунок 13. ВЭЖХ-хроматограммы изучаемых субстанций.
(20E – 20-гидроксиэкдизон, Гк – галловая кислота, Кк – кофейная кислота, Рт – рутин).

Концентрация 20Е в экстракте серпухи составляла 15 мг/г сух. веса. Максимальный уровень 20Е (254 мг/г сух. веса) наблюдался в серпистене. Эти данные сопоставимы с результатами, полученными ранее Селяским и соавторами, где концентрация 20Е в экстракте серпухи составляла 40.6 мг/г экстракта (Селясин и др., 2016). Несмотря на отсутствие 20Е в экстракте пажитника, в составе этого экстракта, судя по времени удержания, могут присутствовать другие экдистероиды, включая 25S-инокостерон и экдизон, которые содержатся в серпистене и экстракте серпухи. Известно, что 20Е и 25S-инокостерон являются мажорными компонентами серпистена и составляют 80% от суммы всех входящих в его состав компонентов (Володина и др., 2010; Селясин и др., 2016).

5.1.2. Изучение радикал-связывающей, хелатирующей и прооксидантной активности исследуемых препаратов

Антиоксидантные свойства различных соединений в значительной степени связаны с их способностью служить ловушками для свободных радикалов. В наших экспериментах радикал-связывающая активность (РСА) (IC_{50}) определялась как концентрация, при которой исследуемый образец связывает 50% свободных радикалов DPPH[•]. Следует отметить, что чем меньше значение IC_{50} , тем сильнее радикал-связывающая активность соединения. В качестве стандарта был использован тролокс, характеризующийся высокой РСА. Результаты определения РСА представлены в таблице 5.

Максимальную способность к связыванию радикалов проявлял кверцетин: значение IC_{50} для этого соединения было в 2 раза ниже, чем уровень IC_{50} для тролокса. Ресвератрол и комбинированный препарат кверцетина и ресвератрола «Трансверол» также обладали высокой антирадикальной активностью. Экдистероид 20-гидроксиэкдизон и биодобавка «Серпистен» были в 50 раз менее активны, чем кверцетин. Более высокая антирадикальная активность кверцетина по отношению к 20Е (в 43 раза) была также отмечена

ранее при исследовании антиоксидантных свойств фитоэкдистероидов смолёвки гунтской (Mamadalieva *et al.*, 2011). Среди исследованных экстрактов наибольшую PCA имел экстракт вина, который содержал максимальный уровень полифенолов. PCA для экстрактов кожицы винограда, пажитника и серпухи были соответственно в 1.3, 2.8 и 4.2 раза ниже, чем у вина, что в целом соответствует более низкому содержанию полифенолов в этих экстрактах. Наблюдаемая зависимость между содержанием полифенолов и величиной PCA согласуется с результатами других исследований, в которых было показано, что более высокое содержание фенольных соединений в составе экстракта соответствует более высокому значению PCA (Prior *et al.*, 2005; Badarinath *et al.*, 2010; Gülçin, 2012; Alam, 2013).

Таблица 5. Радикал-связывающая (IC_{50}), хелатирующая (EC_{50}) и прооксидантная активность исследуемых препаратов.

Исследуемые препараты	IC_{50} , мг/мл	EC_{50} , мг/мл	Скорость продукции H_2O_2 , нмоль/мин·мг сух. веса
Контроль (ДМСО)	нет	нет	0
Экстракт вина	0.088	2.54	881.1 ± 13.6
Экстракт кожицы винограда	0.118	1.24	98.6 ± 4.3
Трансверол	0.015	0.61	97.7 ± 7.5
Кверцетин	0.004	0.06	982.7 ± 13.2
Ресвератрол	0.015	нет	43.5 ± 1.6
Экстракт серпухи	0.368	5.84	8.0 ± 0.5
Экстракт пажитника	0.244	3.93	27.3 ± 0.8
Серпистен	0.203	51.64	2.0 ± 0.6
20-гидроксиэкдизон (20E)	0.197	90.82	0
Тролокс	0.008	нет	0
Дипиридил	нет	0.20	0

Примечания: 0 – не обнаружено, нет – вещество не обладает данной активностью.

Хелатирование металлов переменной валентности, в первую очередь ионов железа, является наиболее эффективным путем подавления образования гидроксильных радикалов и процессов перекисного окисления, что вносит большой вклад в антиоксидантную активность различных соединений. Величина EC_{50} отражает концентрацию вещества, необходимую для хелатирования 50% Fe^{2+} . Аналогично IC_{50} , чем меньше значение EC_{50} , тем

выше хелатирующая способность (ХС). В качестве стандарта использовался хелатор Fe^{2+} дипиридил. Результаты определения хелатирующей способности исследуемых препаратов представлены в таблице 5. Максимальную ХС демонстрировал кверцетин, который был в 3.3 раза активнее, чем стандартный хелатор дипиридил (Таблица 5). Ресвератрол не обладал способностью хелатировать двухвалентное железо, что подтверждает результаты более ранних исследований (Belguendouz *et al.*, 1997). Трансверол был в 10 раз менее активен, чем кверцетин. ХС экистероидов значительно уступала хелатирующей способности полифенолов. EC_{50} для 20Е была в 1500 раз выше, а для серпистена – в 860 раз выше, чем для кверцетина. Все экстракты проявляли меньшую способность хелатировать железо, чем кверцетин, но были активнее, чем экистероиды. Наибольшую хелатирующую активность среди экстрактов показал экстракт кожицы винограда, далее по степени убывания активности располагались экстракты вина, пажитника и серпухи. В отличие от РСА, не наблюдалось полного соответствия между хелатирующей способностью и общим содержанием полифенолов в экстрактах. В частности, ХС экстракта кожицы винограда, который содержал в 2 раза меньше полифенолов, чем вино, была в 2 раза выше, чем у экстракта вина. Это указывает на важность качественного состава полифенолов, входящих в экстракты. В рассматриваемом случае экстракт кожицы винограда содержал в 2 раза больше кверцетина, имеющего высокую хелатирующую активность, чем экстракт вина.

В аэробных условиях многие редокс-активные соединения демонстрируют способность к аутоокислению с образованием АФК, таких как $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . Для оценки прооксидантной активности исследуемых препаратов мы измеряли скорость продукции H_2O_2 (Таблица 5). Результаты показали, что максимальной способностью к образованию H_2O_2 обладал кверцетин. Скорость продукции H_2O_2 при аутоокислении ресвератрола была в 22.6 раза ниже по сравнению с кверцетином. Трансверол был в 10.1 раза менее активен, чем кверцетин. При этом 20Е, тролокс и дипиридил не проявляли способности

к аутоокислению. Среди экстрактов наибольшей способностью к аутоокислению обладал экстракт вина, содержащий наибольшее количество полифенолов, его активность была лишь на 10% меньше, чем у кверцетина. Далее по степени убывания располагались экстракт виноградной кожицы, пажитника и серпухи, активность которых была соответственно в 9, 32 и 110 раз ниже, чем у вина. Серпистен, содержащий наименьшее количество полифенолов среди изученных препаратов, проявлял наиболее низкую способность к аутоокислению. Ранее в работах других исследователей также была показана возможность быстрого аутоокисления фенольных соединений в составе различных экстрактов с образованием значительных концентраций перекиси водорода (Long *et al.*, 2000; Halliwell, 2008; Oliveira *et al.*, 2011; Eghbaliferiz, Iranshahi, 2016).

Впервые проведенное комплексное изучение антирадикальных, хелатирующих и прооксидантных свойств исследуемых препаратов с учетом качественного и количественного состава полифенолов и экдистероидов способствует лучшему пониманию механизмов их воздействия на растущие культуры бактерий.

5.2. Изучение влияния исследуемых препаратов на растущие культуры бактерий *E. coli*

5.2.1. Влияние исследуемых препаратов на физиологические параметры культуры

Предварительные эксперименты позволили выявить концентрации препаратов, которые не оказывали бактерицидного действия на растущие культуры *E. coli*: ДМСО – 25 мкл/мл, экстракт вина – 3.6 мг/мл, экстракт кожицы винограда – 3.8 мг/мл, трансверол – 160 мкг/мл, экстракты серпухи и пажитника – 0.4 мг/мл, серпистен – 0.08 мг/мл, 20-гидроксиэкдизон – 0.1 мг/мл (0.2 mM), тролокс – 0.03 мг/мл (0.1 mM), дипиридил – 0.02 мг/мл (0.1 mM). Действие ресвератрола и кверцетина было изучено в диапазоне концентраций

1-100 и 1-40 мкг/мл соответственно. ДМСО использовался в качестве контроля, поскольку служил растворителем для исследуемых препаратов.

В большинстве случаев инкубация бактерий с исследуемыми соединениями приводила к некоторому ингибированию удельной скорости роста (μ) относительно контроля (Рисунок 14, здесь и далее в тексте за 0 принято время, соответствующее 20 мин предобработки).

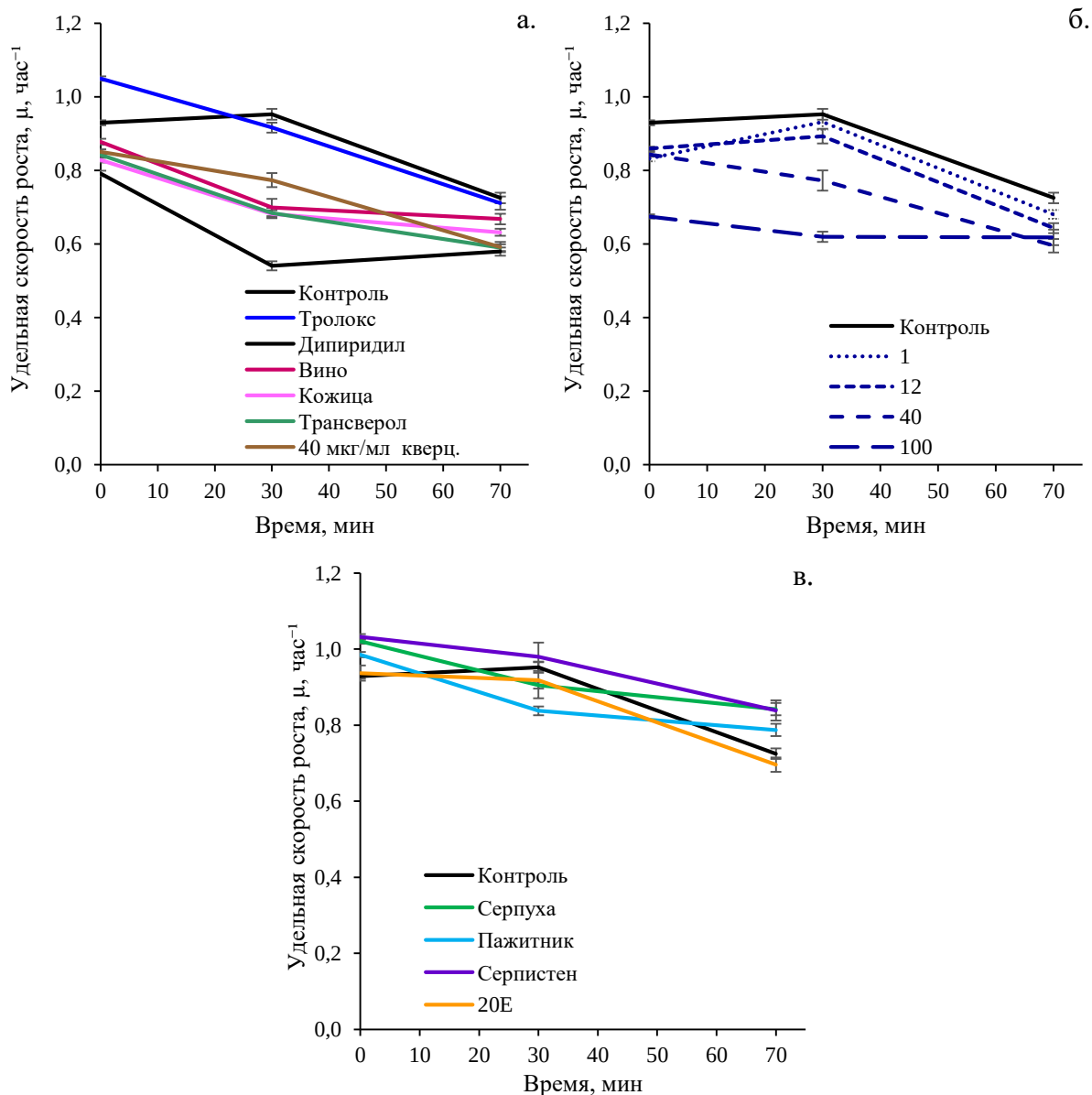


Рисунок 14. Влияние исследуемых препаратов на удельную скорость роста *E. coli*.
а – препараты, содержащие полифенолы; б – 1-100 мкг/мл ресвератрол; в – препараты, содержащие эдикстероиды.

Наибольшую степень ингибирования роста вызывал дипиридил (на 43%).

Экстракты вина, кожицы винограда и трансверол снижали μ на 28% (Рисунок

14а). Тролокс и низкая доза кверцетина (1 мкг/мл) не влияли на скорость роста бактерий. Кверцетин в концентрации 40 мкг/мл снижал μ на 19% (Рисунок 14а). Внесение ресвератрола в среду культивирования вызывало дозозависимое снижение μ (на 35% при максимальной дозе 100 мкг/мл) (Рисунок 14б). Среди экдистероидсодержащих препаратов наибольшее ингибирующее влияние на рост бактерий оказывал экстракт пажитника (на 12% от контрольного уровня) (Рисунок 14в).

Снижение скорости роста бактерий при добавлении кверцетина сопровождалось дозозависимым торможением дыхания, которое регистрировалось по повышению pO_2 в среде (Рисунок 15а). Мы также проследили за изменением уровня внеклеточного K^+ в культурах *E. coli*, обработанных кверцетином. Доза 1 мкг/мл способствовала некоторому выходу ионов калия из клеток, в то время как более высокие дозы стимулировали поглощение K^+ клетками (Рисунок 15б).

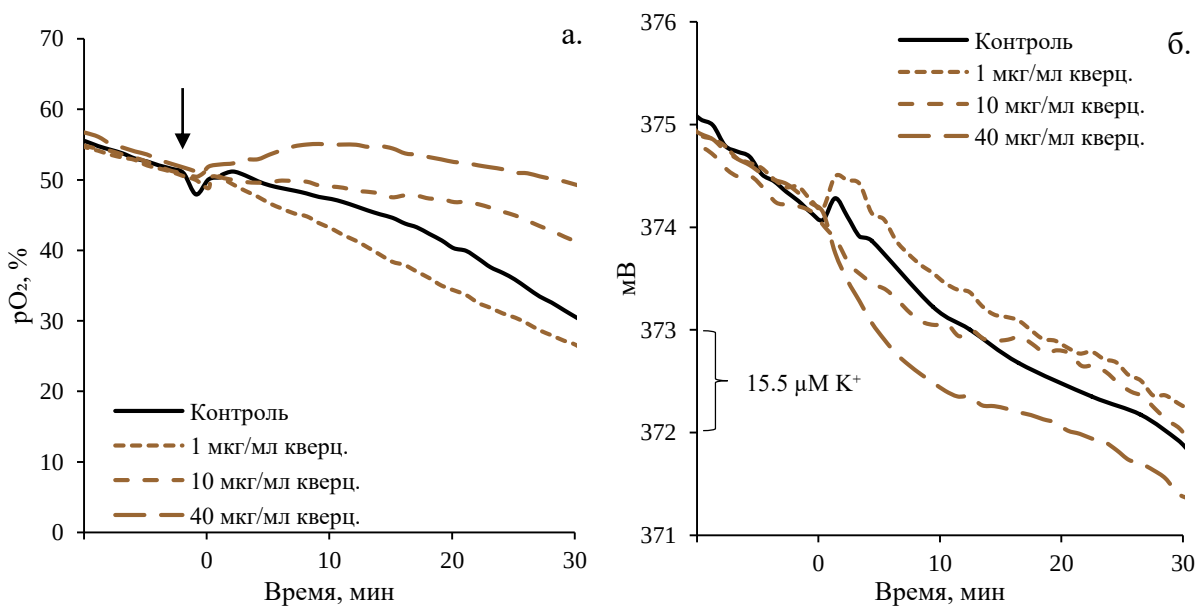


Рисунок 15. Влияние 1-40 мкг/мл кверцетина на потребление кислорода (а) и уровень внеклеточного K^+ (б) у *E. coli* BW25113.

С использованием потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя DiBAC₄(3), мы проследили за изменением мембранного потенциала ($\Delta\psi$) *E. coli* при внесении 1-40 мкг/мл кверцетина и 1-100 мкг/мл ресвератрола в среду культивирования. Отрицательно заряженные молекулы красителя не

могут проникать в нормальные клетки вследствие отрицательного заряда с внутренней стороны мембраны, поэтому клетки, окрашенные DiBAC₄(3), можно рассматривать как деполяризованные. Через 10 мин после внесения ДМСО (контрольные условия) количество флуоресцирующих клеток, утративших мембранный потенциал, возрастало в 2 раза с последующим возвращением к исходному уровню в течение 60 мин. Добавление кверцетина или ресвератрола вызывало дополнительное падение мембранного потенциала, которое имело дозозависимый характер (Рисунок 16а, б).

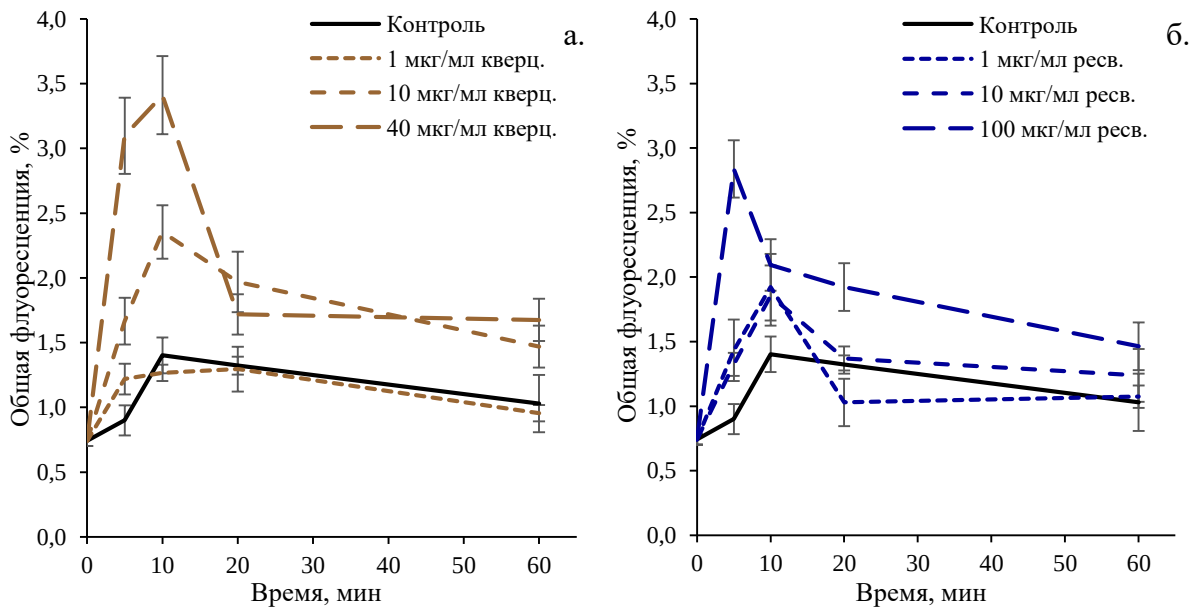


Рисунок 16. Изменение доли клеток *E. coli* BW25113, окрашенных DiBAC₄(3), утративших мембранный потенциал, от общего числа клеток.
а – 1-40 мкг/мл кверцетин; б – 1-100 мкг/мл ресвератрол.

Максимальные изменения по сравнению с контролем наблюдались через 5 мин после внесения 40 мкг/мл кверцетина и 100 мкг/мл ресвератрола, когда количество клеток, утративших мембранный потенциал, возрастало в 3.4 и 3.2 раза соответственно. Через 20 мин инкубации доля флуоресцирующих клеток снижалась, но продолжала оставаться повышенной в течение всего времени культивирования. На рисунке 17 показано увеличение числа деполяризованных (флуоресцирующих) клеток через 5 мин после внесения кверцетина в среду.

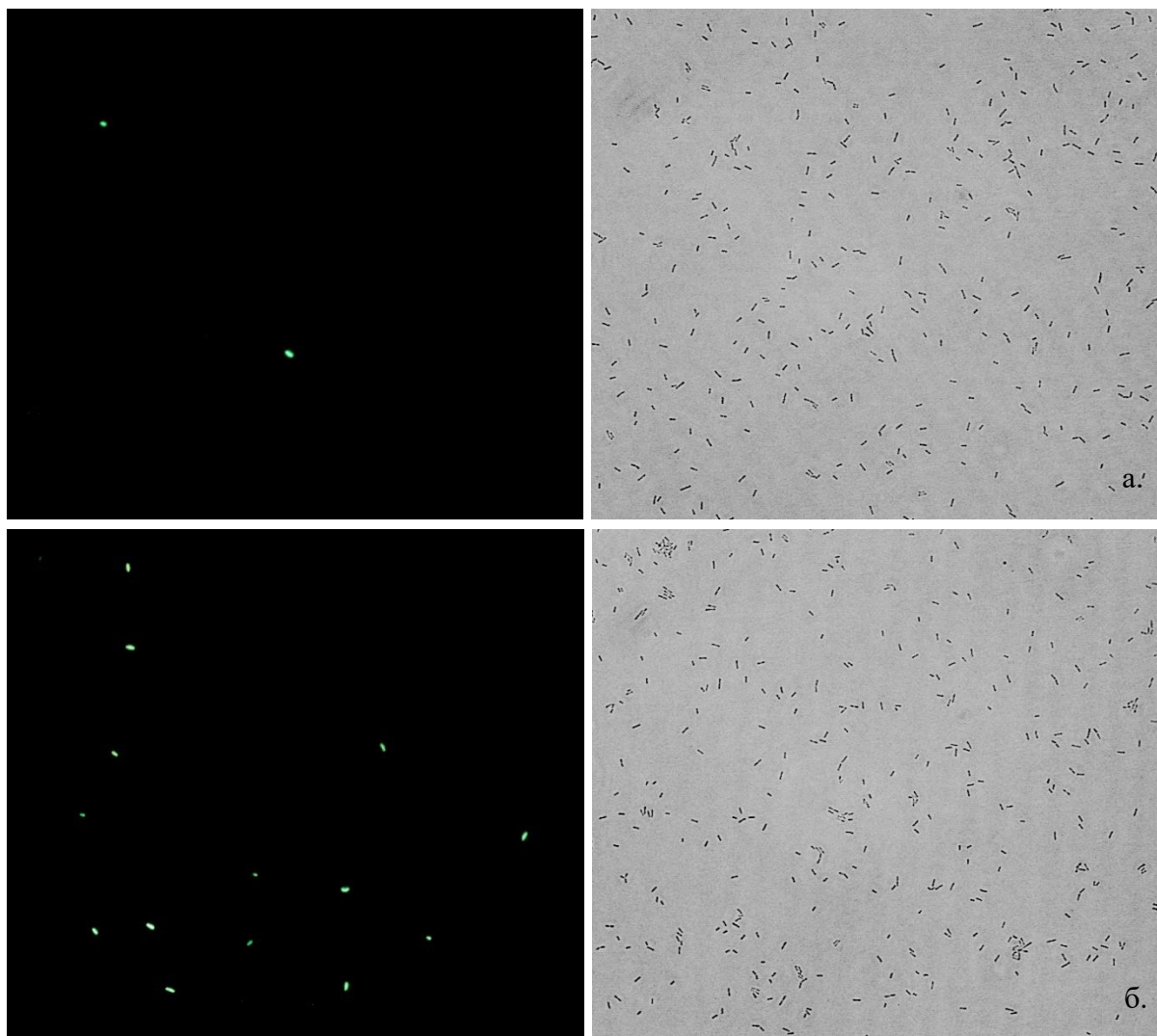


Рисунок 17. Доля флуоресцирующих, утративших мембранный потенциал, клеток *E. coli* от общего числа клеток.

а – в контрольных условиях; б – через 5 мин экспозиции к 40 мкг/мл кверцетина.

В целом наши данные хорошо согласуются с результатами других исследований, в которых богатые полифенолами препараты и чистые соединения оказывали ингибирующее действие на рост бактерий, в частности *E. coli* (Dolara *et al.*, 2005; Cushnie, Lamb, 2011; Watson *et al.*, 2013).

5.2.2. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию стрессовых регулонов

Биологическая активность различных соединений и их смесей может проявляться путем модуляции активности генов, входящих в состав стрессовых регулонов. В наших экспериментах изучалось влияние исследуемых препаратов на экспрессию генов *katG*, *katE*, *rpoS(katF)*, *sodA* и *sulA(sfiA)* путем измерения активности β -галактозидазы в клетках, несущих

слияния промоторов этих генов с геном *lacZ*. У бактерий *E. coli* в логарифмической фазе роста экспрессия гена *katG*, кодирующего каталазу НРІ, индуцируется в ответ на повышение концентрации перекиси водорода под контролем транскрипционного регулятора OxyR (Storz *et al.*, 1990). В стационарной фазе экспрессия гена *katG* контролируется глобальным регулятором общего стрессового ответа RpoS (Ivanova *et al.*, 1994). Под контролем регулятора RpoS находится также ген *katE*, кодирующий каталазу НРІІ. Регуляция транскрипции самого гена *rpoS*, кодирующего сигма-фактор RpoS, носит сложный характер и находится под контролем других глобальных транскрипционных факторов (Lange, Hengge-Aronis, 1994; Hengge-Aronis, 2002). Экспрессия гена *sodA*, кодирующего Mn-супероксиддисмутазу, регулируется с участием шести глобальных транскрипционных регуляторов и индуцируется под контролем SoxRS в присутствии соединений, генерирующих супероксид (Touati, 1997). Ген *sulA*, кодирующий ингибитор клеточного деления, входит в SOS-регулон, индуцируется при повреждении ДНК и контролируется регуляторными белками RecA и LexA (Simmons *et al.*, 2008).

Мониторинг слияния *katG::lacZ* показал, что в течение периодического роста в контрольных условиях (добавление ДМСО) наблюдается некоторое снижение экспрессии гена *katG*. Добавление полифенолов и экстрактов вина и кожицы винограда приводило к повышению экспрессии *katG* по отношению к контролю. В культурах, обработанных кверцетином и ресвератролом, индукция была в пределах 30% (Рисунок 18а). Наиболее выраженный индуцирующий эффект наблюдался в клетках, обработанных экстрактами вина и кожицы винограда, где активность β -галактозидазы повышалось в 2.2 и 1.7 раза соответственно (Рисунок 18а).

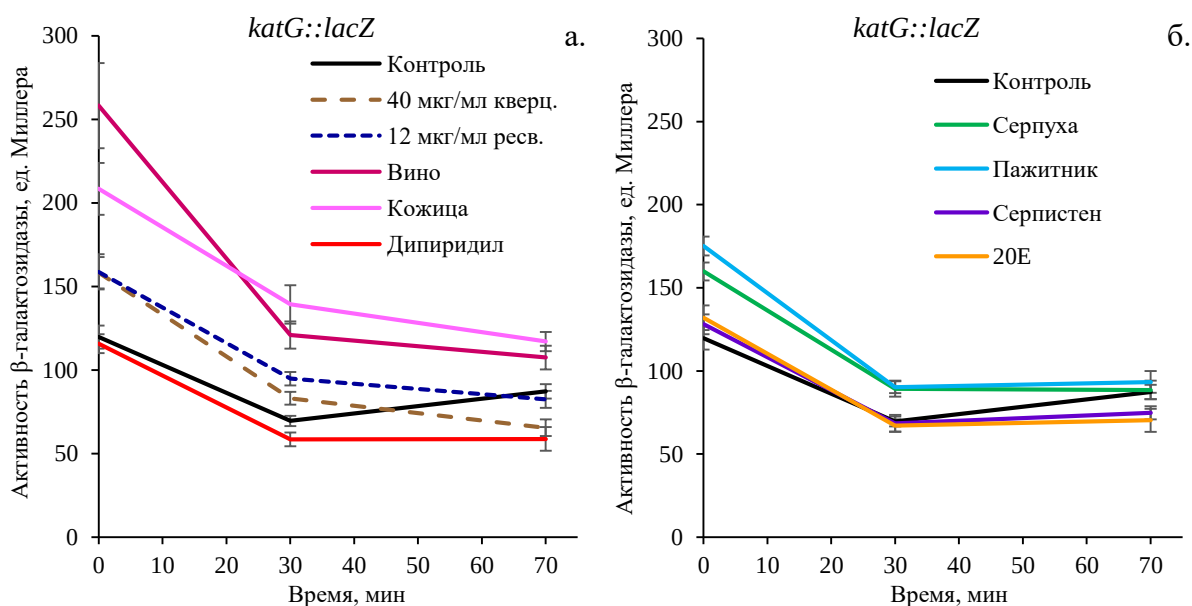


Рисунок 18. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию гена *katG*.
а – препараты, содержащие полифенолы; б – препараты, содержащие экистероиды.

Экстракты серпухи и пажитника также вызывали повышение экспрессии гена *katG* в 1.3 и 1.5 раза соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 18б). Серпистен и 20-гидроксиэкидизон не оказывали существенного влияния на экспрессию *katG*. Следует отметить, что выраженный индуцирующий эффект на ген *katG* проявляли препараты, обладающие высокой скоростью продукции H_2O_2 (Таблица 5).

В контрольных условиях экспрессия слияния *katE::lacZ* не изменялась в течение всего времени культивирования бактерий. Добавление трансверола, 40 мкг/мл кверцетина и экстракта кожицы винограда приводило к снижению активности β -галактозидазы на 24-36% (Рисунок 19а). Среди экистероидсодержащих субстанций некоторый ингибирующий эффект на экспрессию гена *katE* проявлял экстракт пажитника (до 16%) (Рисунок 19б). Остальные исследуемые препараты не оказывали существенного влияния.

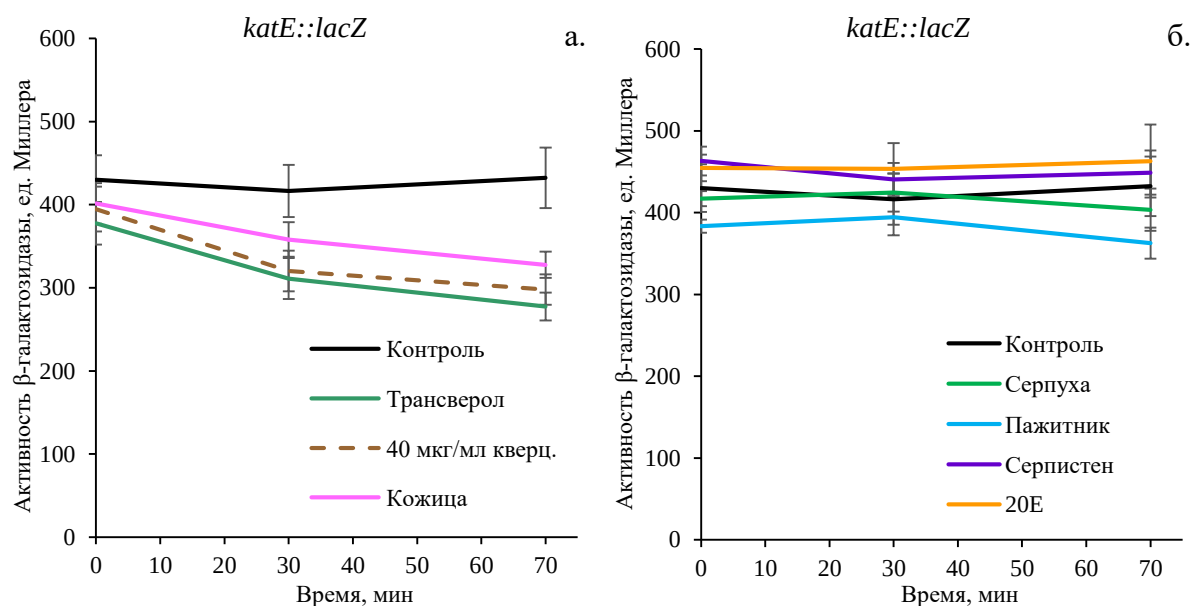


Рисунок 19. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию гена *katE*.
а – препараты, содержащие полифенолы; б – препараты, содержащие экдистероиды.

Дипиридил, экстракты вина и кожицы винограда ингибировали экспрессию гена *rpoS* на 30-40% по отношению к контролю (Рисунок 20а). Напротив, в культурах, обработанных 12 мкг/мл ресвератрола, экспрессия *rpoS::lacZ* поддерживалась на более высоком уровне на протяжении всего периода культивирования. Добавление в среду экстракта пажитника ингибировало экспрессию гена *rpoS* на 27% (Рисунок 20б). Остальные исследуемые субстанции не оказывали существенного влияния на экспрессию этого гена. Интересно, что, несмотря на то, что ген *katE* входит в RpoS регулон, мы не наблюдали полной аналогии в характере влияния исследуемых препаратов на гены *rpoS* и *katE*. Совпадение эффектов наблюдалось только в случае экстрактов кожицы винограда и пажитника. В остальных случаях эффекты не совпадали или отсутствовали. Причиной может быть сложный характер регуляции уровня белка RpoS, который осуществляется не только на уровне транскрипции гена *rpoS*, но также на уровне трансляции мРНК и протеолиза готового белка.

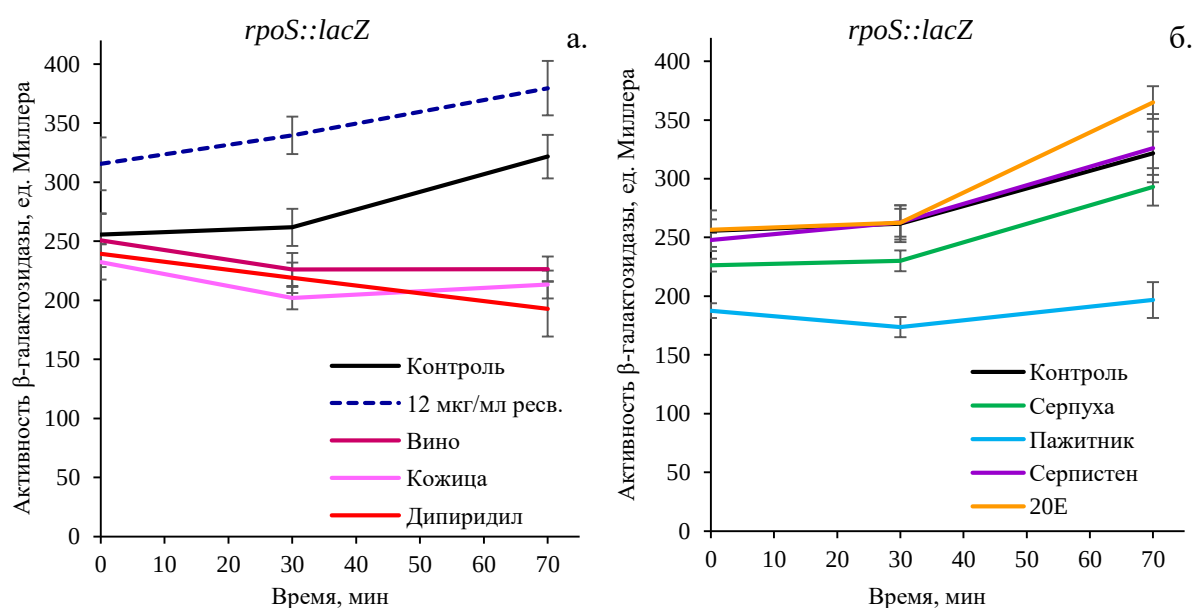


Рисунок 20. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию гена *rpoS*.
а – препараты, содержащие полифенолы; б – препараты, содержащие экдистероиды.

В отличие от генов *rpoS* и *katE*, наблюдался определенный параллелизм между характером влияния исследуемых препаратов на экспрессию генов *katG* и *sodA* (Рисунки 18, 21). В частности, как и в случае *katG* (Рисунок 18), добавление высоких доз кверцетина и ресвератрола, а также экстрактов вина и кожицы винограда индуцировало экспрессию гена *sodA* от 21 до 53% (Рисунок 21а). Обработка бактерий экстрактом пажитника также показывала индуцирующий эффект, повышая экспрессию слияния *sodA::lacZ* на 25% (Рисунок 21б).

Поскольку ген *sodA* индуцируется в присутствии соединений, продуцирующих супероксид, можно предположить, что при аутоокислении исследуемых препаратов одновременно с перекисью водорода, являющейся индуктором для гена *katG*, образуется радикал супероксид аниона.

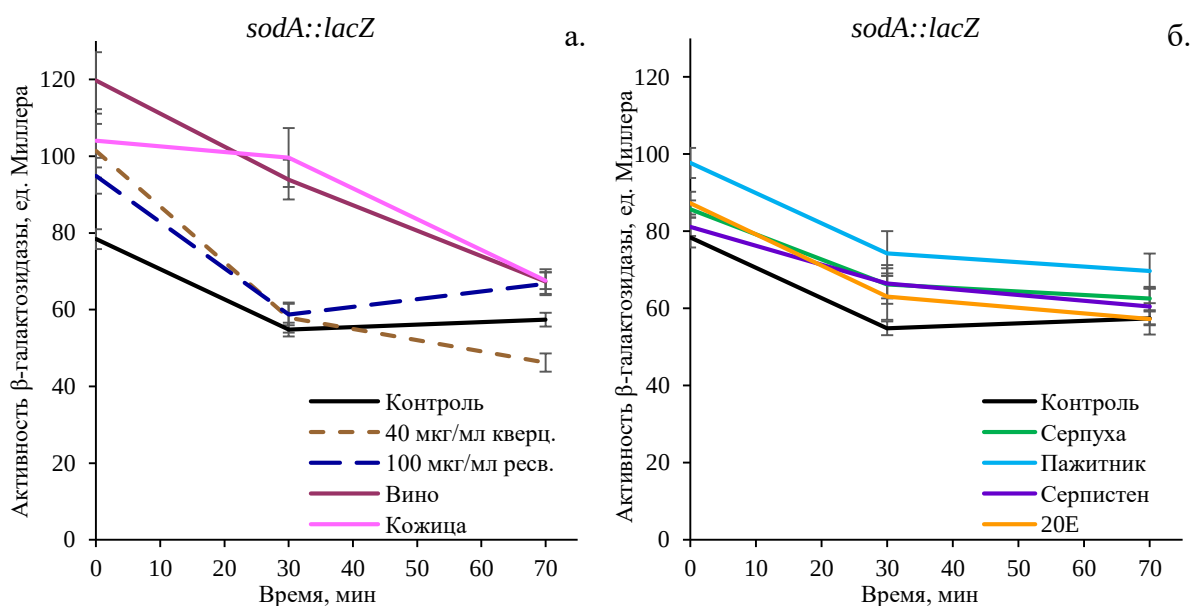


Рисунок 21. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию гена *sodA*.
а – препараты, содержащие полифенолы; б – препараты, содержащие экдистероиды.

Корреляционный анализ показал высокую степень зависимости между количеством полифенолов в изучаемых экстрактах и экспрессией генов *katG* и *sodA*, коэффициенты корреляции (r) в обоих случаях были $+0.98$, $p < 0.05$ (Рисунок 22а, б).

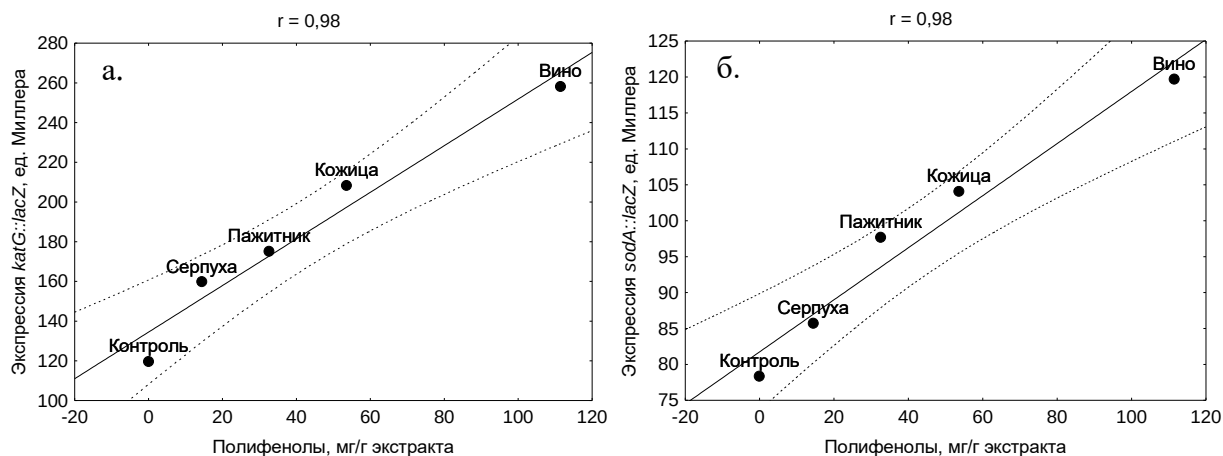


Рисунок 22. Корреляции между количеством полифенолов (мг/г сух. веса) в экстрактах и индукцией антиоксидантных генов.
а – ген *katG*, кодирующий каталазу HPI, б – ген *sodA*, кодирующий MnSOD.

Наблюдаемая нами у бактерий *E. coli* индукция экспрессии антиоксидантных генов препаратами, богатыми полифенолами, хорошо согласуется с ранними исследованиями, в которых показано повышение активности различных антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и др.) в ответ на действие

полифенолов в отношении большинства испытанных культур про- и эукариотических клеток (Halliwell, 2008; Oktyabrsky *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2009, 2010, 2012; Alam *et al.*, 2013; Parisi *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2013; Samoilova *et al.*, 2014).

Различные АФК-генерирующие агенты приводят к индукции генов, принадлежащих не только регулонам OxyR и SoxRS, но и SOS-регулону, в состав которого входит ген *sulA* (Imlay, Linn, 1987; Kato *et al.*, 1994). В наших экспериментах экспрессия слияния *sulA(sfiA)::lacZ* в контроле оставалась на относительно постоянном уровне. Добавление тролокса повышало экспрессию гена относительно контроля (Рисунок 23а).

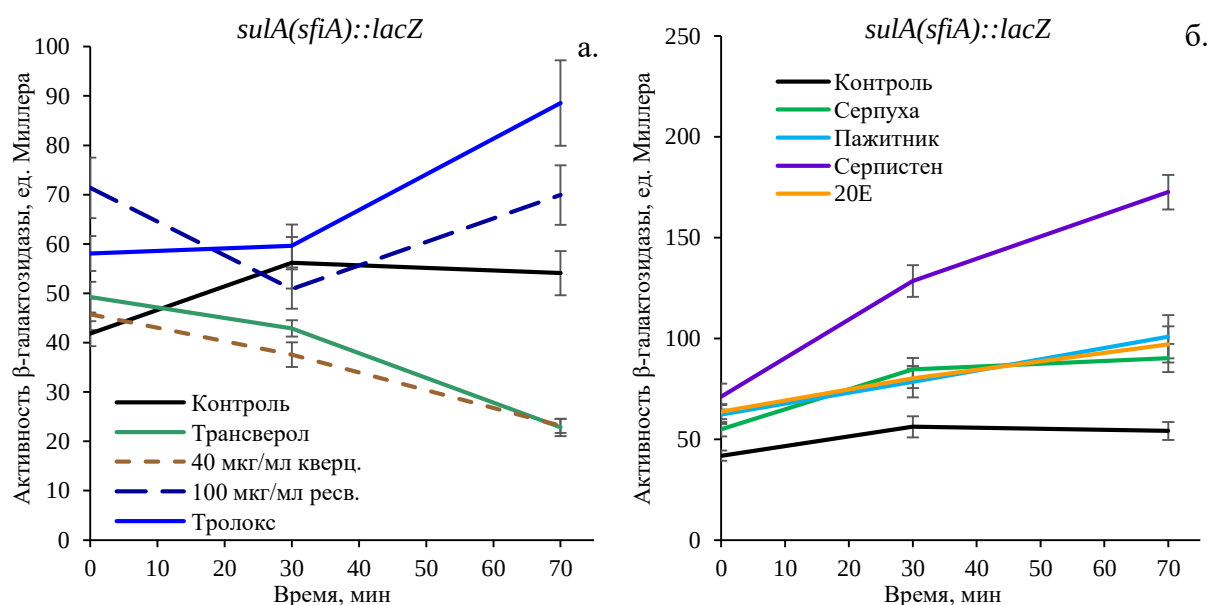


Рисунок 23. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию гена *sulA*.
а – препараты, содержащие полифенолы; б – препараты, содержащие экдистероиды.

Трансверол и кверцетин (40 мкг/мл), напротив, снижали экспрессию этого гена в 2.3 раза. Все экдистероидсодержащие препараты повышали активность β -галактозидазы в клетках в 1.3-1.7 раза (Рисунок 23б). Наибольшее индуцирующее воздействие проявлял серпистен, который стимулировал экспрессию *sulA(sfiA)::lacZ* в 3.2 раза по сравнению с необработанными культурами. Наблюдаемые эффекты исследуемых препаратов на экспрессию гена *sulA(sfiA)* могут быть связаны как с повреждающим действием на ДНК, так и с влиянием на регуляторные сигнальные пути, как это показано для 20E

в эукариотических клетках (Lafont, Dinan, 2003; Dinan, Lafont, 2006; Hu *et al.*, 2012).

5.2.3. Антиоксидантное действие исследуемых препаратов на клетки *E. coli* при пероксидном стрессе

Антиоксидантное действие различных соединений на живые организмы определяется их влиянием на продукцию и деструкцию радикалов, на связывание ионов металлов с переменной валентностью и индукцию защитных систем клеток. Мы изучили антиоксидантное действие исследуемых препаратов на растущие культуры *E. coli* в условиях окислительного стресса, вызванного добавлением перекиси водорода. С этой целью измеряли скорость роста аэробно растущих бактерий *E. coli* до и после воздействия 2 мМ H_2O_2 . Добавление H_2O_2 приводило к резкому снижению удельной скорости роста с последующим постепенным ее повышением по мере снижения концентрации перекиси водорода в среде. При этом предобработка бактерий изучаемыми препаратами модулировала ингибирующий эффект H_2O_2 на скорость роста. Для количественной оценки этого модулирующего эффекта рассчитывали индекс АОА, который равен отношению удельной скорости роста бактерий, предобработанных изучаемыми субстанциями, к удельной скорости роста без предобработки через 30 мин после добавления H_2O_2 . Экстракты вина и кожицы винограда, трансверол, 40 мкг/мл кверцетина и дипиридил значительно снижали бактериостатическое действие перекиси водорода, индекс АОА варьировал от 3.8 до 8.8 (Рисунок 24а). Слабое антиоксидантное действие оказывали тролокс, 1 мкг/мл кверцетина и 1-100 мкг/мл ресвератрола (индекс АОА < 1.7).

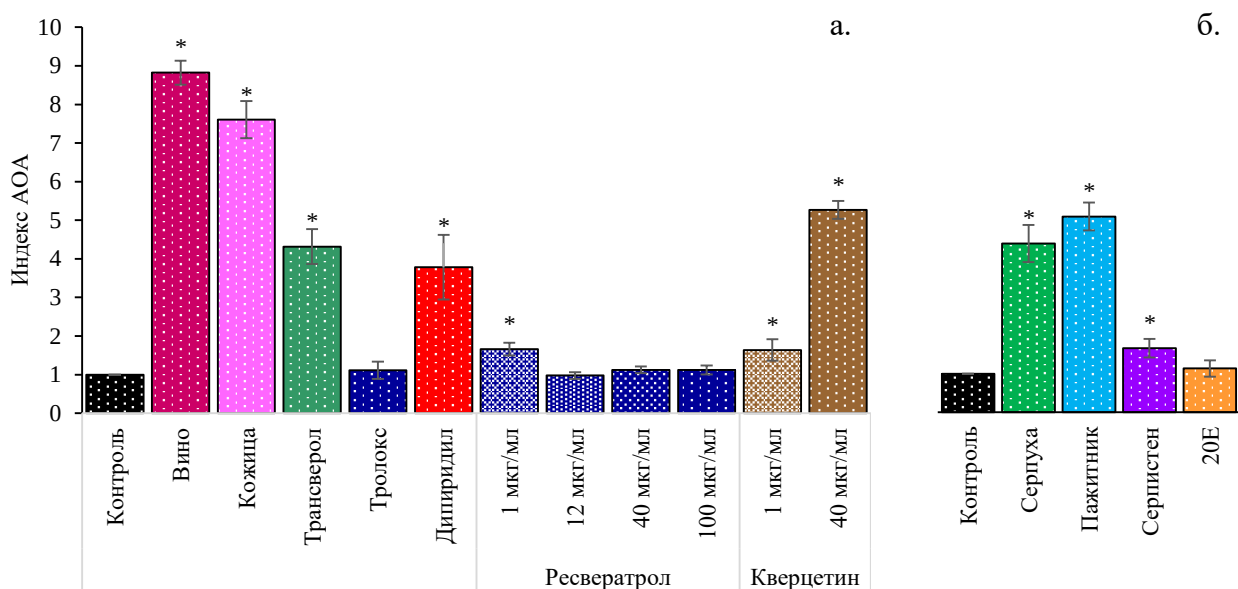


Рисунок 24. Модулирующее действие препаратов, содержащих ПФ (а) или ЭС (б) на значение АОА при экспозиции *E. coli* к 2 мМ H_2O_2 .

Предобработка бактерий экстрактами серпухи и пажитника значительно снижала бактериостатическое действие H_2O_2 , индекс АОА был 4.4 и 5.1 соответственно (Рисунок 24б). Серпистен оказывал слабое антиоксидантное действие (индекс АОА < 1.7).

Была обнаружена высокая степень корреляции между экспрессией генов *katG* и *sodA* в культурах, предобработанных испытываемыми субстанциями и индексом АОА после внесения 2 мМ H_2O_2 в среду культивирования. Коэффициенты корреляции были равны + 0.97 и + 0.95, для генов *katG* и *sodA* соответственно ($p < 0.05$) (Рисунок 25).

В целом, максимальный антиоксидантный эффект в условиях пероксидного стресса был характерен для препаратов, проявляющих высокую хелатирующую активность и способность индуцировать ген *katG*, что способствует снижению токсического действия H_2O_2 и ускорению ее деструкции каталазой.

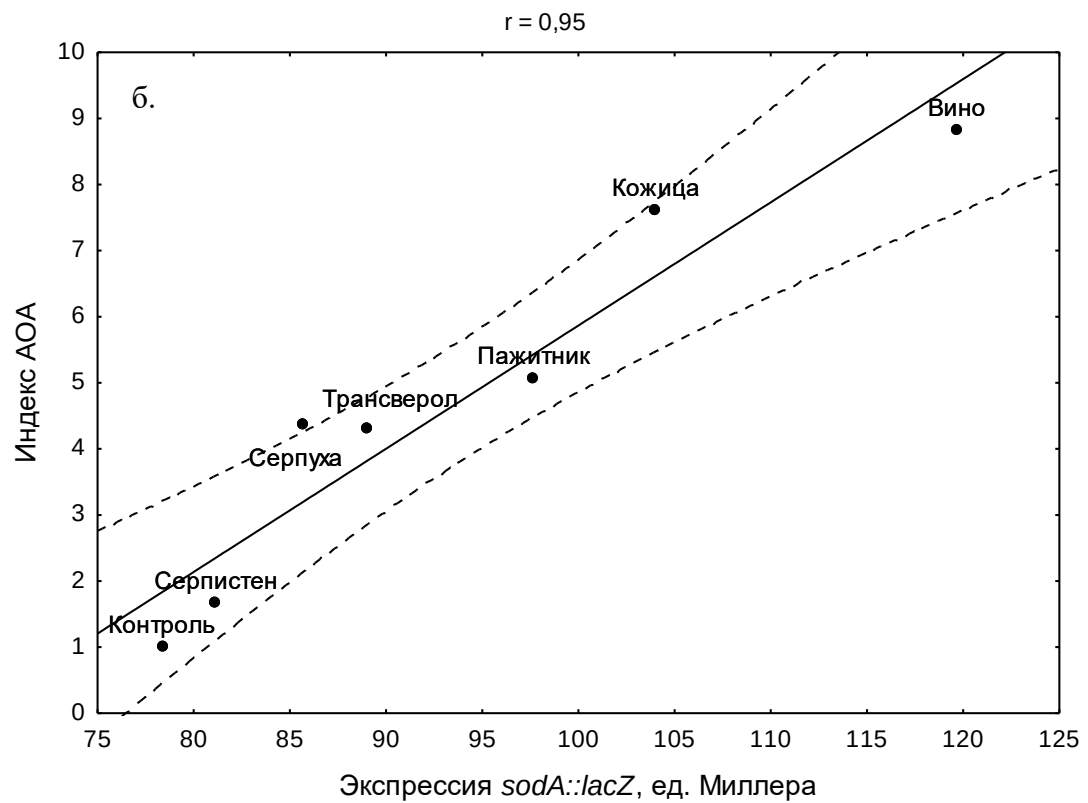
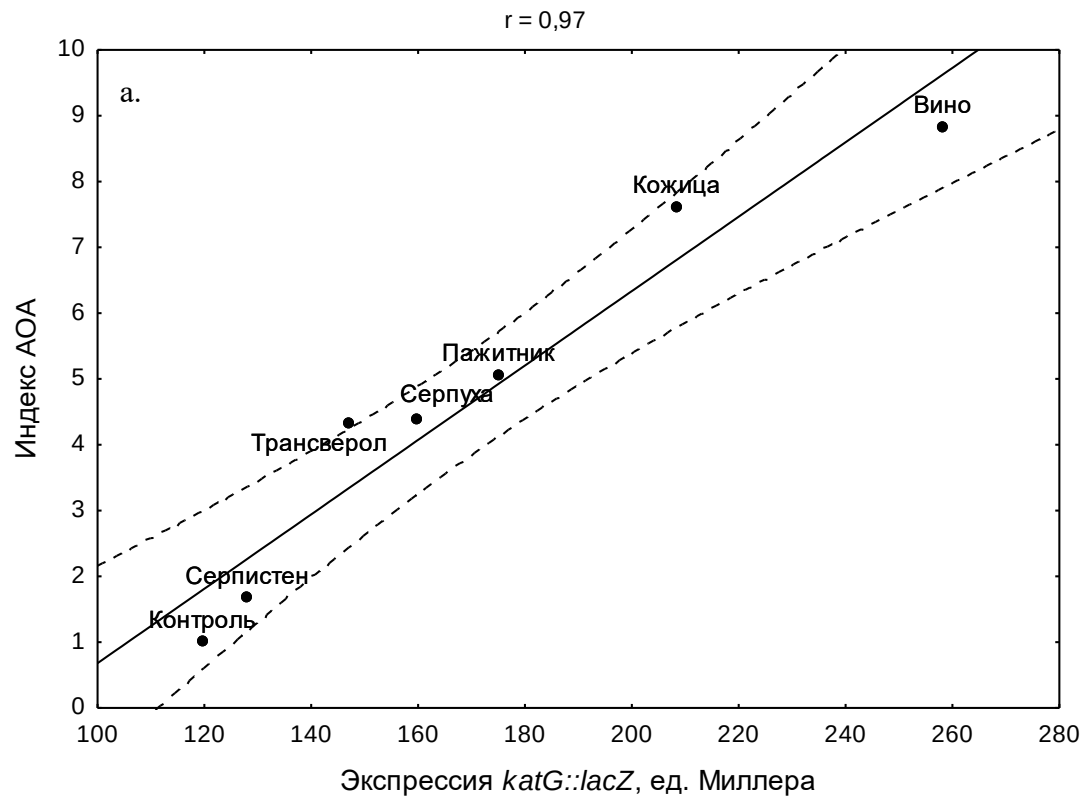


Рисунок 25. Корреляция между экспрессией антиоксидантных генов в момент добавления 2 mM H₂O₂ и индексом АОА.

а – ген *katG*, кодирующий каталазу НР1, б – ген *sodA*, кодирующий MnSOD.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИФЕНОЛЫ И ЭКДИСТЕРОИДЫ, НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ *E. COLI* К РАЗЛИЧНЫМ АНТИБИОТИКАМ

В настоящее время в научном сообществе ведется дискуссия об участии окислительного стресса в механизме летального действия бактерицидных антибиотиков и связанной с этим возможности модуляции устойчивости бактерий к антимикробным препаратам с использованием редокс-активных соединений (Goswami *et al.*, 2006, Kohanski *et al.*, 2007; Dwyer *et al.*, 2007, 2015; Liu, Imlay, 2013; Keren *et al.*, 2013; Ezraty *et al.*, 2013). Поскольку биологически активные субстанции, содержащие полифенолы и экдистероиды, способны изменять редокс-статус клеток и активность стрессовых регулонов, мы исследовали влияние изучаемых препаратов на бактерии *E. coli* в условиях стресса, вызванного действием антибиотиков разных классов. В качестве критериев чувствительности бактерий к антибиотикам использовали удельную скорость роста, время наступления лизиса, способность к образованию колоний и минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотиков.

6.1. Изучение влияния исследуемых препаратов на чувствительность *E. coli* к действию антибиотиков разных классов

6.1.1. Изучение влияния исследуемых препаратов на чувствительность *E. coli* к ципрофлоксацину

Ципрофлоксацин относится к группе фторхинолонов, первичной мишенью которых является синтез ДНК. В наших условиях МИК ципрофлоксацина составляла 0.016 мкг/мл (Таблица 6), что соответствует данным литературы (Phillips *et al.*, 1988; Fàbrega *et al.*, 2009).

Испытуемые субстанции оказывали различное влияние на минимальную ингибирующую концентрацию ципрофлоксацина. Низкие дозы ресвератрола и кверцетина не изменяли МИК, но при увеличении концентрации обоих

соединений до 40 мкг/мл наблюдался протекторный эффект, более выраженный для кверцетина (в 16 раз) (Таблица 6).

Таблица 6. Влияние испытуемых препаратов на МИК антибиотиков для *Escherichia coli* BW25113.

Вещества и экстракты	Ципрофлоксацин	Канамицин	Стрептомицин	Цефотаксим
Контроль (ДМСО)	0.016	5	5	0.08
Экстракт вина	0.064 (4)	10 (2)	10 (2)	0.08
Экстракт виноградной кожицы	0.064 (4)	5	5	0.08
Трансверол	0.256 (16)	10 (2)	10 (2)	0.16 (2)
1 мкг/мл кверцетин	0.016	5	5	0.08
40 мкг/мл кверцетин	0.256 (16)	10 (2)	10 (2)	0.16 (2)
1 мкг/мл ресвератрол	0.016	5	5	0.08
12 мкг/мл ресвератрол	0.016	5	5	0.08
40 мкг/мл ресвератрол	0.032 (2)	5	5	0.16 (2)
100 мкг/мл ресвератрол	0.032 (2)	10 (2)	5	0.08
Экстракт серпухи	0.016	10 (2)	10 (2)	0.16 (2)
Экстракт пажитника	0.016	10 (2)	10 (2)	0.08
Серпистен	0.016	5	5	0.08
20-гидроксиэкдизон (20Е)	0.016	10 (2)	10 (2)	0.08
Тролокс	0.016	5	5	0.08
Дипиридил	0.032 (2)	10 (2)	10 (2)	0.08

Индексы в скобках рассчитаны как отношение МИК (мкг/мл) в среде, содержащей антибиотик и препарат к МИК в среде, содержащей только антибиотик (контроль).

Содержащий кверцетин трансверол также увеличивал МИК ципрофлоксацина в 16 раз. Хелатор дипиридил повышал МИК в 2 раза. Инкубация бактерий в присутствии экстрактов виноградной кожицы и вина увеличивала МИК в 4 раза. Присутствие экстрактов серпухи и пажитника, серпистена, 20Е и тролокса в среде культивирования не оказывало влияния на МИК для ципрофлоксацина. Ранее было показано, что такие соединения, как глутатион, аскорбиновая кислота, тиомочевина и дипиридил способны модифицировать действие хинолонов, повышая МИК в несколько раз

(Goswami *et al.*, 2006; Kohanski *et al.*, 2007; Wang, Zhao 2009; Samoilova *et al.*, 2014).

Действие ципрофлоксацина на растущие периодические культуры *E. coli* было изучено при трех различных концентрациях антибиотика: 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл (Рисунок 26). Низкие дозы ципрофлоксацина (0.03 и 0.3 мкг/мл) не ингибировали рост бактерий в течение 30 мин после внесения в среду культивирования, но через 70 мин экспозиции доза 0.3 мкг/мл снижала скорость роста на треть от контрольного уровня. Напротив, μ клеток, обработанных 3 мкг/мл этого антибиотика, резко снижалась сразу после его добавления, и к концу культивирования была близка к нулю (Рисунок 26а).

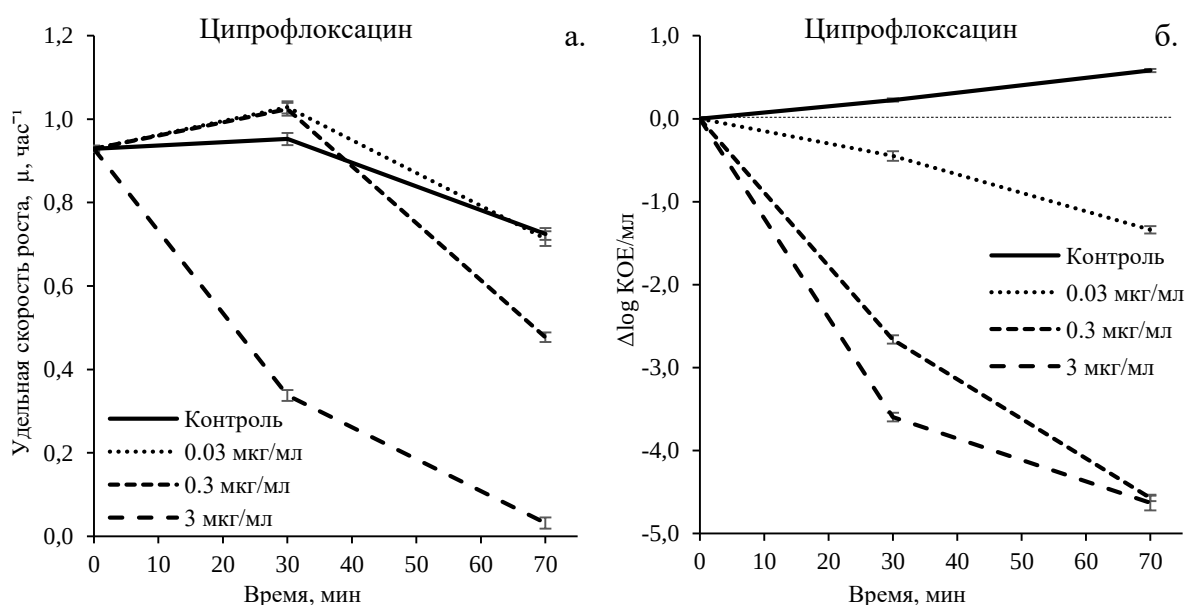


Рисунок 26. Воздействие различных концентраций ципрофлоксацина на *E. coli*.
а – удельная скорость роста; б – колониеобразующая способность.

Экспозиция бактерий к ципрофлоксацину приводила к резкому снижению числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Через 70 мин инкубации с 0.03 мкг/мл антибиотика число КОЕ было в 83 раза ниже контрольного уровня (Рисунок 26б). При более высоких концентрациях ципрофлоксацина КОЕ снижалось до 77000 раз по сравнению с контрольной культурой.

Как было указано ранее (раздел 5.2.1), наличие в среде большинства испытуемых препаратов приводило к некоторому снижению удельной скорости роста бактерий. В тесте на колониеобразующую способность

присутствие в среде экстракта вина, 40 мкг/мл кверцетина, трансверола, серпистена и дипиридила снижало КОЕ до 1.8 раза по сравнению с контролем. Остальные препараты не влияли на количество образовавшихся колоний (не показано).

В присутствии антибиотика модифицирующее воздействие субстанций на удельную скорость роста *E. coli* в наибольшей степени проявлялось при экспозиции к самой высокой дозе ципрофлоксацина. В этом случае клетки, предобработанные трансверолом и 40 мкг/мл кверцетина, росли со скоростью в 5 и 7 раз более высокой, чем в отсутствие предобработки. Напротив, предобработка 1 мкг/мл ресвератрола и дипиридилом способствовала снижению удельной скорости роста (Рисунок 27а).

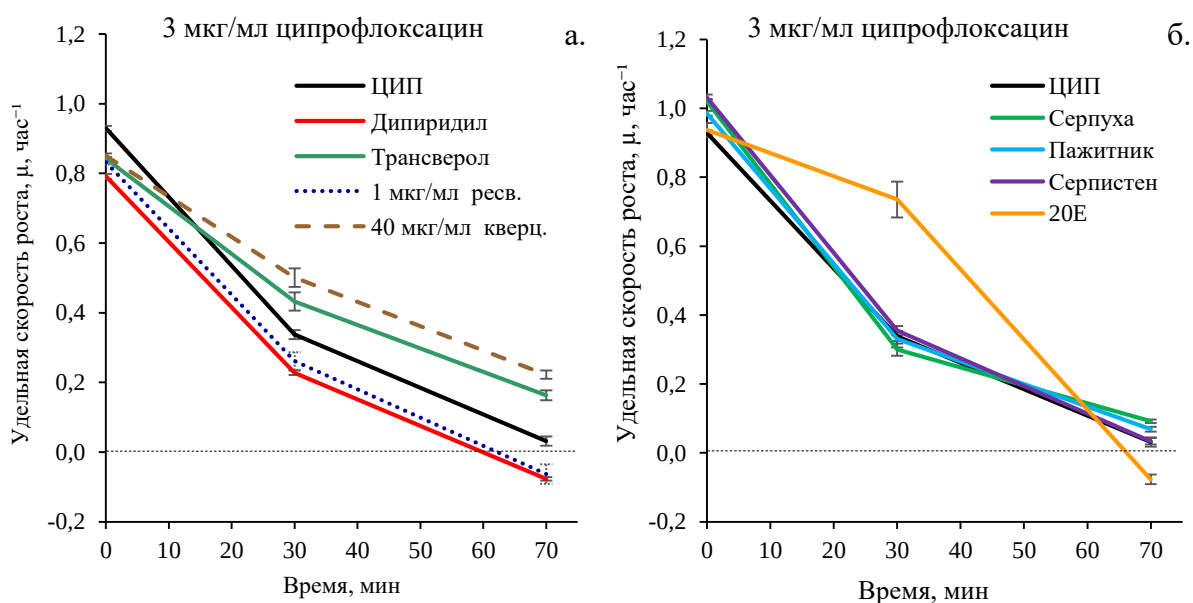


Рисунок 27. Модифицирующее воздействие препаратов на удельную скорость роста *E. coli* при экспозиции к 3 мкг/мл ципрофлоксацина (ЦИП).
а – препараты, содержащие полифенолы; б – препараты, содержащие экдистероиды.

Среди препаратов, содержащих экдистероиды, предобработка бактерий 20-гидроксиэкдизоном предотвращала резкое падение скорости роста бактерий в течение 30 мин после внесения 3 мкг/мл ципрофлоксацина (Рисунок 27б). Остальные исследуемые субстанции этой группы не оказывали существенного влияния на μ *E. coli*.

Характер модифицирующего влияния всех исследуемых препаратов на КОЕ в присутствии ципрофлоксацина зависел от вида и концентрации

препарата и дозы антибиотика. Предобработка *E. coli* экстрактами вина и кожицы винограда, трансверолом и высокими концентрациями кверцетина и ресвератрола производила протекторный эффект, вплоть до полного предотвращения бактерицидного действия 0.03 мкг/мл ципрофлоксацина (Рисунок 28). Хелатор дипиридил проявлял несколько менее выраженный защитный эффект. Напротив, концентрация 1 мкг/мл кверцетина и ресвератрола усиливала действие ципрофлоксацина, существенно ускоряя снижение КОЕ (Рисунок 28а).

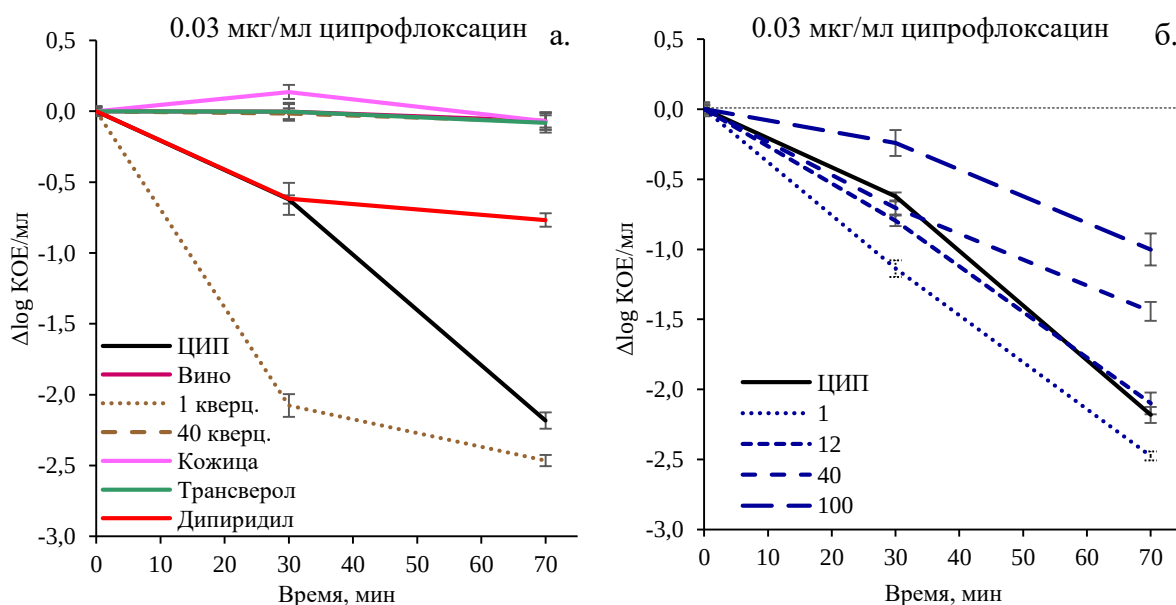


Рисунок 28. Воздействие препаратов на колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к 0.03 мкг/мл ципрофлоксацина (ЦИП).
а – препараты, содержащие полифенолы; б – 1-100 мкг/мл ресвератрол.

При более высоких концентрациях ципрофлоксацина (0.3 и 3 мкг/мл) предобработка бактерий трансверолом, 40 мкг/мл кверцетина и 100 мкг/мл ресвератрола и хелатором дипиридилом оказывала выраженное защитное действие, увеличивая выживаемость бактерий от 3.6 до 26 раз (Рисунок 29а, б). В этих условиях экстракты вина и виноградной кожицы производили более слабый протекторный эффект, увеличивая КОЕ в 3 раза при экспозиции к 3 мкг/мл антибиотика. Предобработка тролоксом не влияла на бактерицидное действие ципрофлоксацина при всех испытанных концентрациях антибиотика.

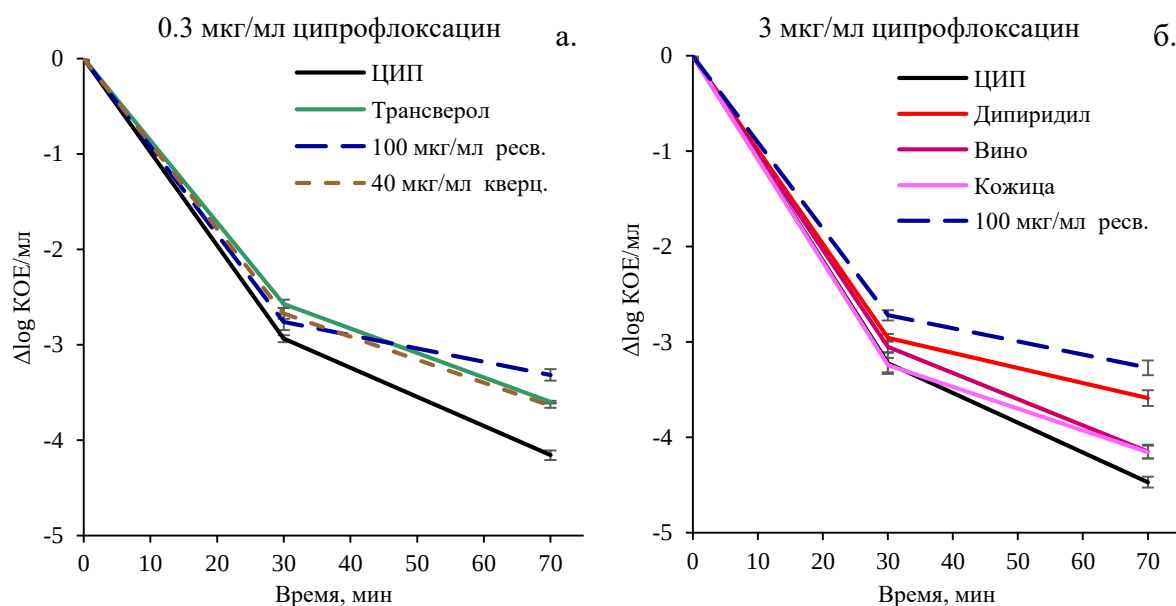


Рисунок 29. Воздействие препаратов, содержащих полифенолы, на колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к ципрофлоксацину (ЦИП).
а – 0.3 мкг/мл ципрофлоксацина; б – 3 мкг/мл ципрофлоксацина.

Предобработка экдистероидсодержащими препаратами также модифицировала колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к фторхинолону. При действии 0.03 мкг/мл ципрофлоксацина предварительная обработка бактерий экстрактами серпухи и пажитника увеличивала число колоний в 3.5 и 4.9 раза соответственно. Напротив, 20Е усиливал действие антибиотика, снижая число КОЕ в 4 раза (Рисунок 30а). Интересно, что при увеличении дозы антибиотика (0.3 и 3 мкг/мл), наблюдался защитный эффект 20Е, когда через 70 мин экспозиции число колоний превышало уровень в культуре, обработанной только антибиотиком, в 4 и 7.5 раз соответственно (Рисунок 30б).

Таким образом, предварительная обработка бактерий *E. coli* препаратами, содержащими полифенолы и эдистероиды, существенно модифицировала действие ципрофлоксацина. Этот результат хорошо согласуется с более ранними данными, полученными сотрудниками ЛФГМ, о выраженном протекторном эффекте кверцетина, танина и другой группы богатых полифенолами растительных экстрактов против бактерицидного действия ципрофлоксацина (Smirnova *et al.*, 2012; Samoilova *et al.*, 2014).

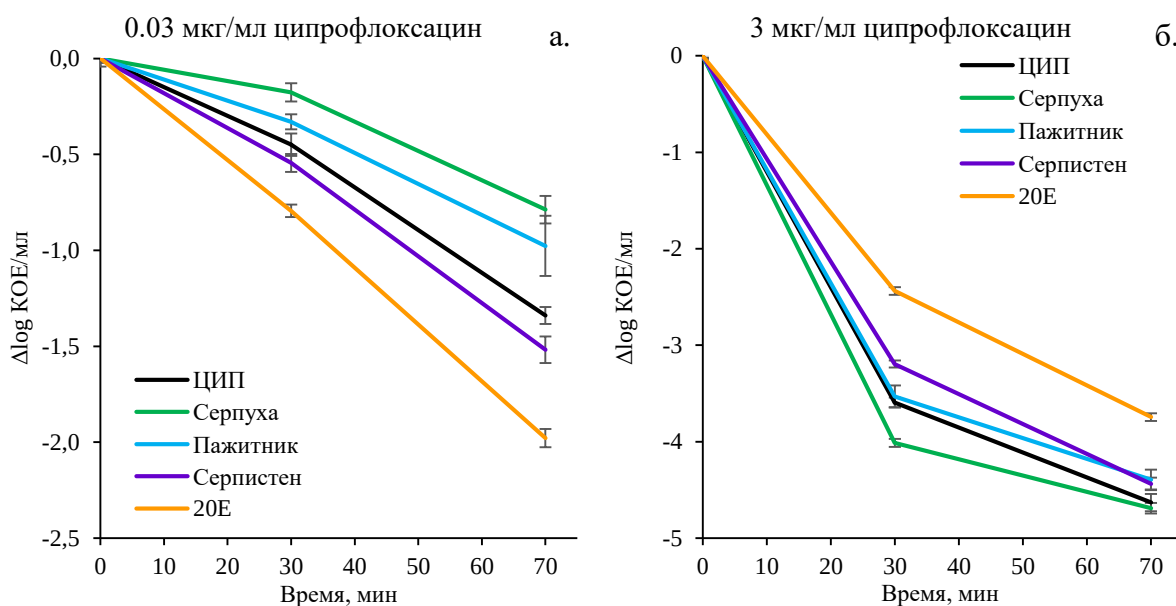


Рисунок 30. Воздействие препаратов, содержащих экидистероиды, на колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к ципрофлоксацину (ЦИП).
а – 0.03 мкг/мл ципрофлоксацина; б – 3 мкг/мл ципрофлоксацина.

Аналогичный эффект был обнаружен в случае полифенола куркумина, который снижал антимикробную активность ципрофлоксацина против *S. typhimurium* и *S. typhi* (Marathe *et al.*, 2013). В настоящей работе впервые показано, что направление и степень модифицирующего действия полифенолов и экидистероидов в значительной степени зависят от концентрации как самого антибиотика, так и препаратов, используемых для предобработки.

6.1.2. Изучение влияния исследуемых препаратов на чувствительность *E. coli* к канамицину

Антибиотик канамицин относится к группе аминогликозидов, мишенью которых в бактериальных клетках является синтез белка. В наших исследованиях МИК канамицина составляла 5 мкг/мл. При этом добавление экстрактов вина, серпухи и пажитника в среду культивирования оказывало слабое защитное действие на бактерии, повышая МИК канамицина в 2 раза (Таблица 6). Хелатор дипиридил, 20Е, высокие концентрации ресвератрола и кверцетина, а также трансверол увеличивали МИК в 2 раза. Остальные препараты не влияли на МИК канамицина.

Экспозиция *E. coli* к 10 мкг/мл канамицина в течение 70 мин приводила к постепенному снижению скорости роста бактерий в 4.6 раза по сравнению с контролем, в то время как доза 40 мкг/мл резко ингибировала рост и приводила к отрицательным значениям μ уже через 50 мин после внесения антибиотика (Рисунок 31а). При этом способность бактерий формировать колонии через 70 мин экспозиции к 10 мкг/мл канамицина снижалась в 85 раз, а при высокой дозе 40 мкг/мл происходило резкое падение числа КОЕ в 77000 раз (Рисунок 31б).

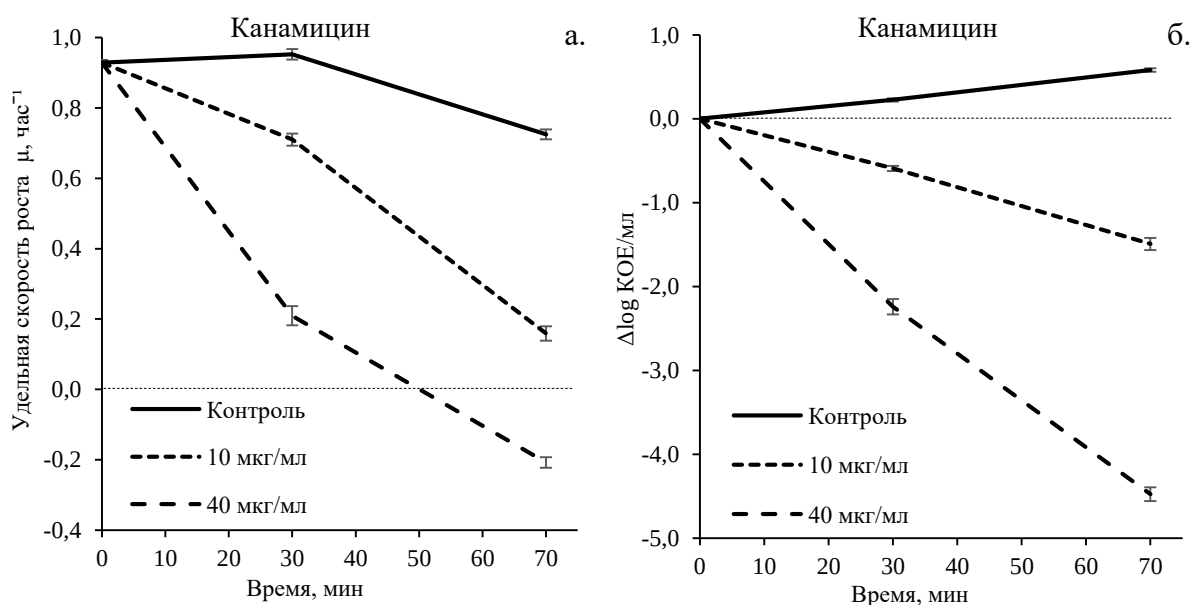


Рисунок 31. Воздействие различных концентраций канамицина на *E. coli*.
а – удельная скорость роста; б – колониеобразующая способность.

Предобработка бактерий дипиридиллом, трансверолом и высокими концентрациями ресвератрола и кверцетина снижала ингибирующее действие 10 мкг/мл антибиотика, повышая μ в 2-3 раза (Рисунок 32а). При 40 мкг/мл канамицина протекторное действие субстанций было выражено в меньшей степени, однако ресвератрол и дипиридил предотвращали резкое падение удельной скорости роста (Рисунок 32б). Примечательно, что экстракт кожицы винограда усиливал ингибирующее действие обеих доз канамицина.

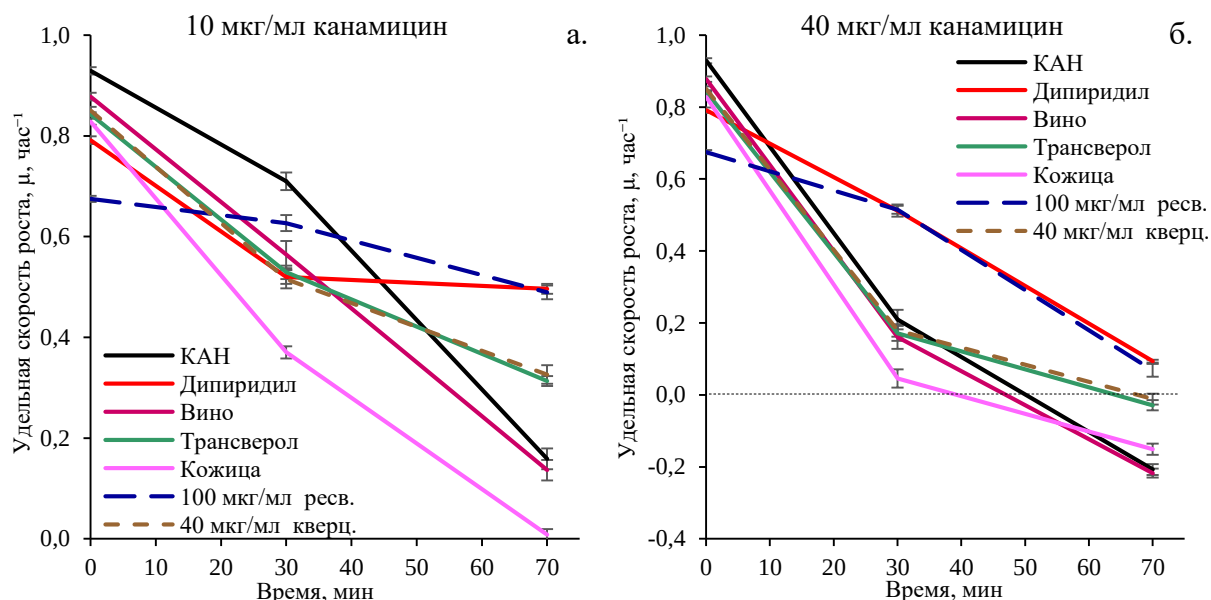


Рисунок 32. Воздействие препаратов, содержащих полифенолы, на удельную скорость роста *E. coli* при экспозиции к канамицину (КАН).
а – 10 $\mu\text{г/мл}$ канамицина; б – 40 $\mu\text{г/мл}$ канамицина.

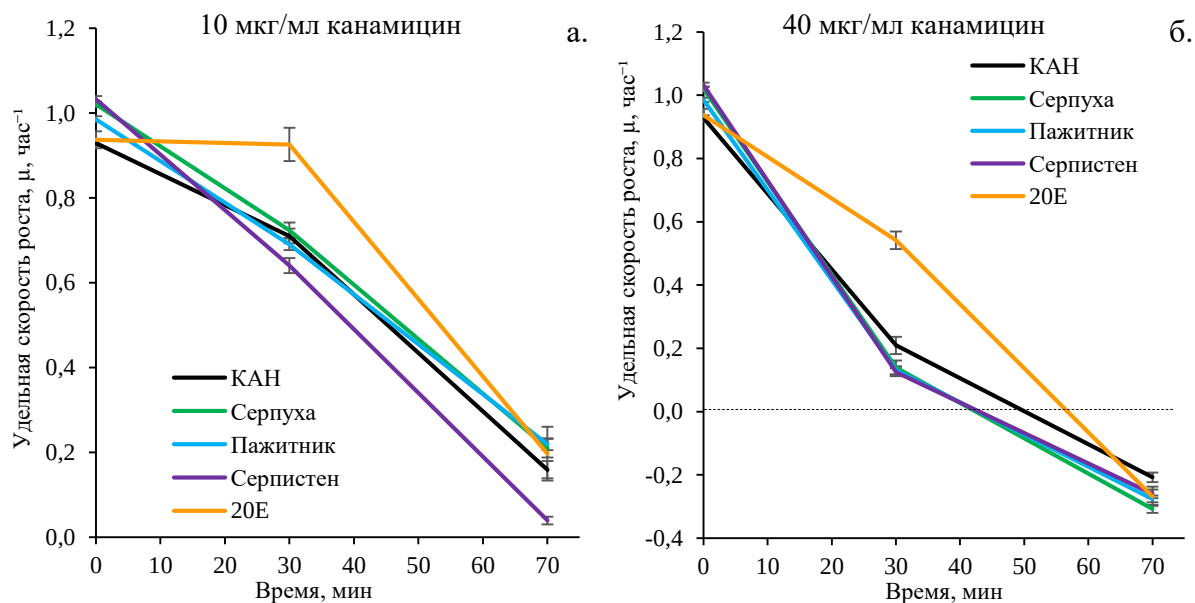


Рисунок 33. Воздействие препаратов, содержащих экидистериоды, на удельную скорость роста *E. coli* при экспозиции к канамицину (КАН).
а – 10 $\mu\text{г/мл}$ канамицина; б – 40 $\mu\text{г/мл}$ канамицина.

Предобработка бактерий серпистеном усиливала ингибирующее действие 10 $\mu\text{г/мл}$ антибиотика, снижая скорость роста бактерий в 4.3 раза через 70 мин экспозиции (Рисунок 33а). При воздействии на культуры 40 $\mu\text{г/мл}$ канамицина, помимо серпистена, ингибирующее влияние также оказывали экстракты серпухи и пажитника, снижая μ в 2 раза уже после 30-ти минутной экспозиции (Рисунок 33б). В этих условиях 20Е, напротив,

предотвращал вызванное обеими концентрациями канамицина падение скорости роста.

В тесте на колониеобразующую способность было обнаружено, что дипиридил и 100 мкг/мл ресвератрола полностью предотвращают снижение числа КОЕ, вызванное 10 мкг/мл канамицина. Менее выраженный протекторный эффект наблюдался при предобработке тролоксом, трансверолом, 12-40 мкг/мл ресвератрола и 40 мкг/мл кверцетина, где количество образовавшихся колоний увеличивалось в 3-8 раз (Рисунок 34а). При экспозиции к 40 мкг/мл канамицина существенное защитное действие сохранялось в случае предобработки бактерий дипиридилом и 100 мкг/мл ресвератрола, трансверол повышал КОЕ в 4 раза (Рисунок 34б). Экстракт виноградной кожицы и низкие концентрации полифенолов ресвератрола и кверцетина стимулировали снижение числа КОЕ до 22 раз уже через 30 мин экспозиции к 40 мкг/мл канамицина.

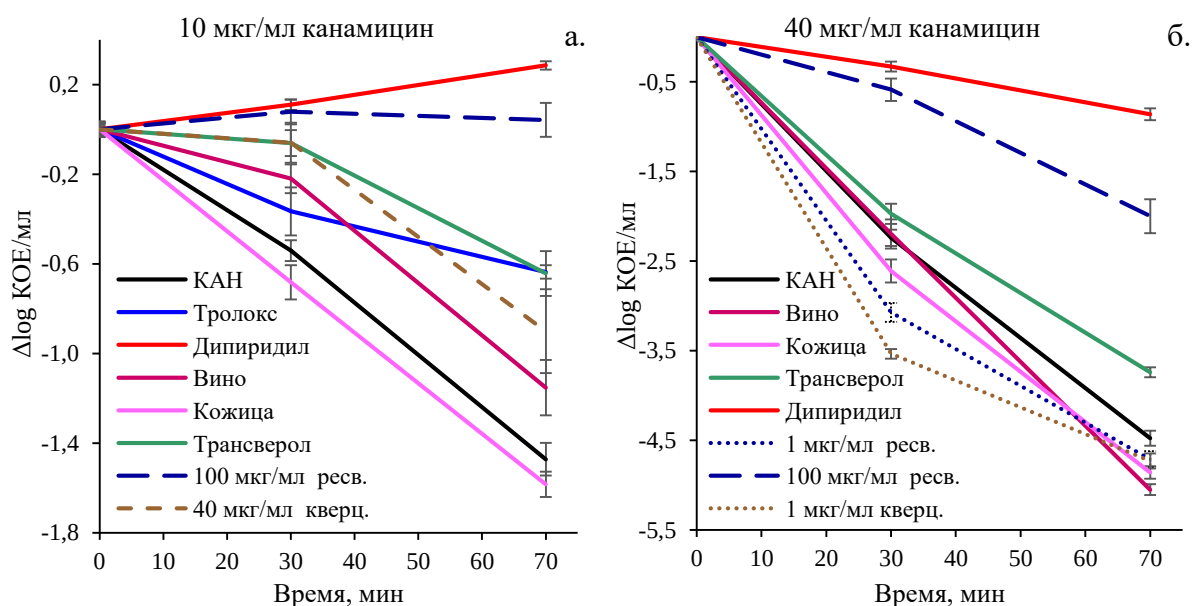


Рисунок 34. Воздействие препаратов, содержащих полифенолы, на колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к канамицину (КАН).

а – 10 мкг/мл канамицина; б – 40 мкг/мл канамицина.

В случае культивирования бактерий в присутствии препаратов, содержащих экидистероиды, было обнаружено, что 20Е полностью защищал *E. coli* от действия низкой дозы канамицина и значительно ингибировал падение числа КОЕ в течение 30 мин после внесения высокой дозы

антибиотика (Рисунок 35а). В свою очередь, действие 10 и 40 мкг/мл канамицина усиливалось в культурах, предобработанных серпистеном и экстрактами серпухи и пажитника. Наиболее выраженный эффект оказывал серпистен, максимально снижая число КОЕ в 2 раза через 70 мин экспозиции к высокой дозе антибиотика (Рисунок 35б).

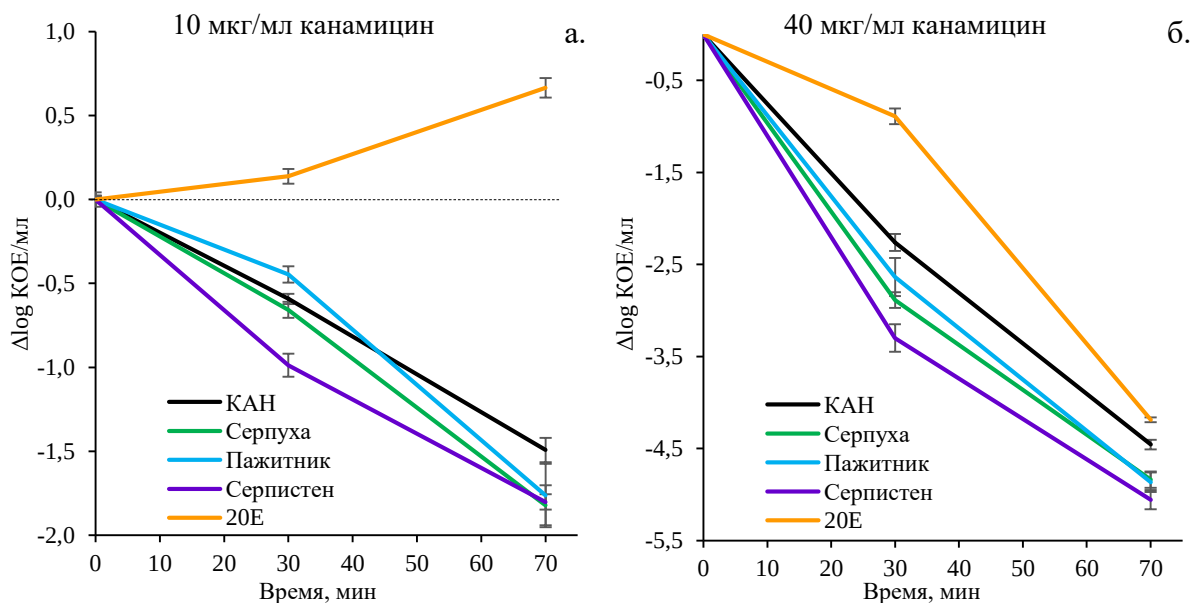


Рисунок 35. Воздействие препаратов, содержащих эдистероиды, на колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к канамицину (КАН).
а – 10 мкг/мл канамицина; б – 40 мкг/мл канамицина.

В целом, во всех тестах (МИК, скорость роста и КОЕ) высокие дозы кверцетина и ресвератрола, трансверол, 20-гидроксиэкдизон и дипиридил оказывали защитное действие против канамицина, что совпадало с эффектом этих соединений при экспозиции бактерий к ципрофлоксацину. Интересно, что низкие дозы кверцетина и ресвератрола вызывали противоположный эффект, усиливая бактерицидное действие обоих антибиотиков. Важной отличительной особенностью является стимуляция бактерицидного действия канамицина серпистеном и экстрактами кожицы винограда, серпухи и пажитника. Ранее повышение бактерицидной активности канамицина отмечалось при предобработке бактерий *E. coli* черным чаем и экстрактами листьев брусники и толокнянки (Samoilova *et al.*, 2014). Примечательно, что 20Е и серпистен, содержащий 20Е в качестве одного из основных компонентов, действовали на активность канамицина противоположным

образом. Это указывает на то, что стимуляция бактерицидной активности канамицина серпистеном, а также экстрактами серпухи и пажитника может быть связана с другим экистероидом (25S-инокостероном), входящим в их состав (Володина и др., 2010).

6.1.3. Изучение влияния исследуемых препаратов на чувствительность *E. coli* к стрептомицину

Антибиотик стрептомицин (как и канамицин) относится к группе аминогликозидов, ингибирующих у бактерий синтез белка. МИК стрептомицина, как и в случае канамицина, была равна 5 мкг/мл (Таблица 6). Среди изученных субстанций экстракты вина, серпухи и пажитника, дипиридил, 20Е, кверцетин (40 мкг/мл) и трансверол оказывали слабое защитное влияние, повышая МИК стрептомицина в 2 раза. Этот эффект был идентичен действию субстанций на МИК канамицина.

Ингибирующее влияние стрептомицина на удельную скорость роста *E. coli* было выражено в несколько меньшей степени, чем у канамицина, а снижение μ до отрицательных значений, вызванное высокой дозой антибиотика, наступало на 10 мин позднее (Рисунки 28а и 36а). Влияние 10 и 40 мкг/мл стрептомицина на способность бактерий образовывать колонии было близким к действию аналогичных концентраций канамицина (Рисунки 18б и 36б).

При экспозиции к стрептомицину сохранялся также выявленный для канамицина характер модифицирующего влияния предобработки исследуемыми препаратами, содержащими полифенолы и экистероиды. В частности, наблюдалось снижение ингибирующего эффекта 10 и 40 мкг/мл стрептомицина на рост после предобработки бактерий высокими дозами кверцетина и ресвератрола, трансверолом и дипиридилом и, напротив, усиление ингибирования роста в присутствии экстракта кожицы винограда (Рисунок 37).

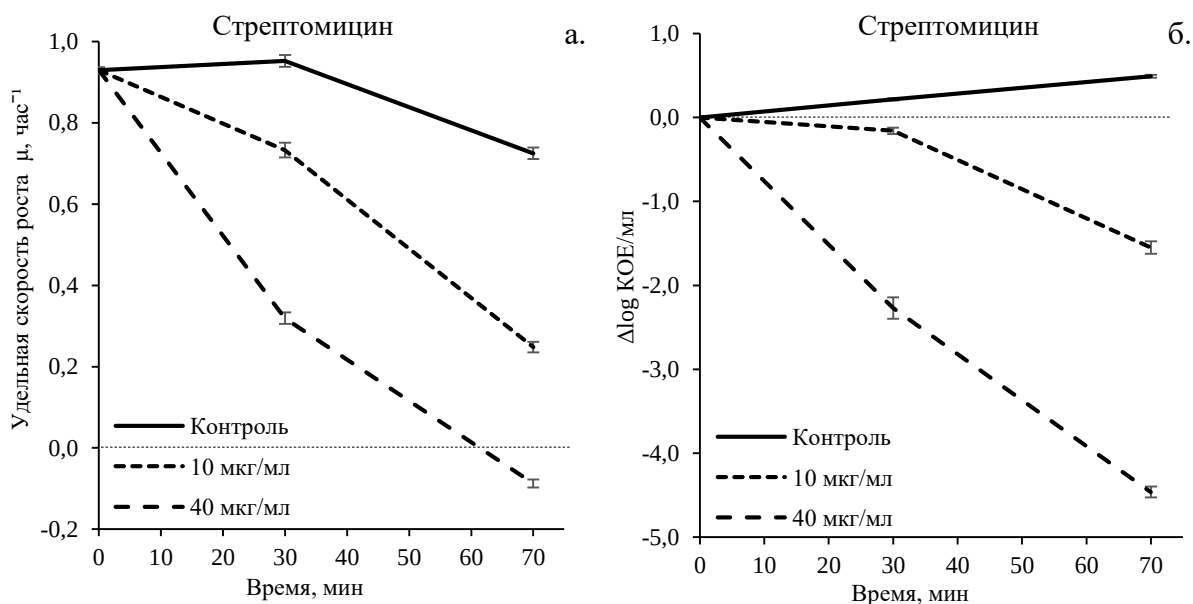


Рисунок 36. Воздействие различных концентраций стрептомицина на *E. coli*.
а – удельная скорость роста; б – колониеобразующая способность.

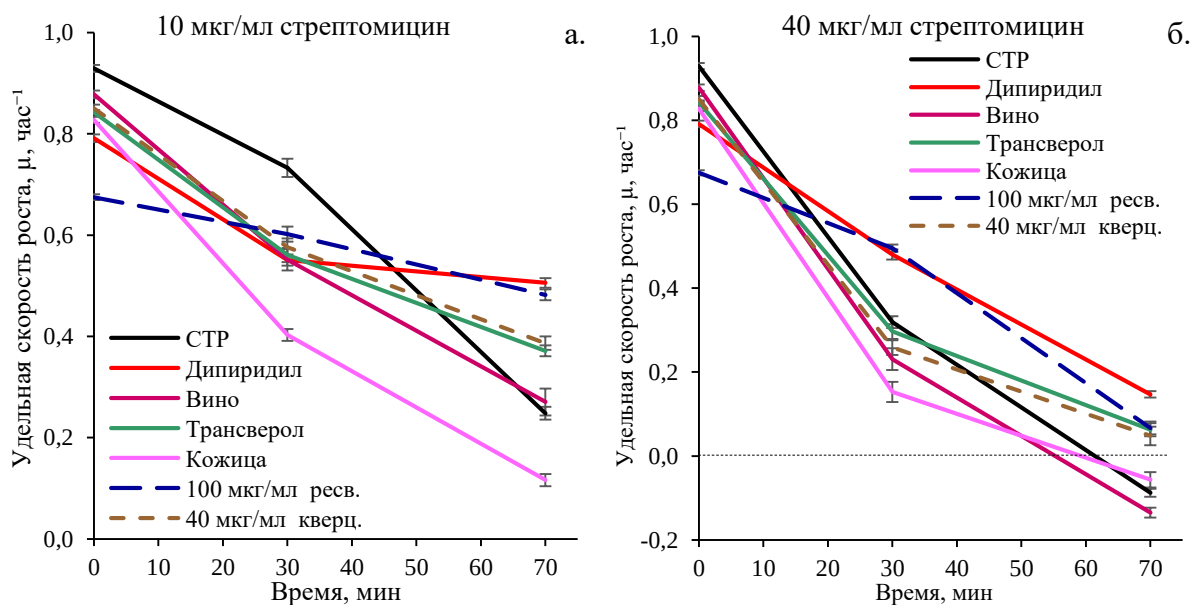


Рисунок 37. Воздействие препаратов, содержащих полифенолы, на удельную скорость роста *E. coli* при экспозиции к стрептомицину (СТР).
а – 10 $\mu\text{g/ml}$ стрептомицина; б – 40 $\mu\text{g/ml}$ стрептомицина.

Как и в случае с канамицином, 20Е оказывал защитное действие на рост бактерий в течение 30 мин экспозиции к обеим дозам стрептомицина (Рисунок 38). Предобработка серпистеном и экстрактами серпухи и пажитника в этих условиях не влияла на скорость роста.

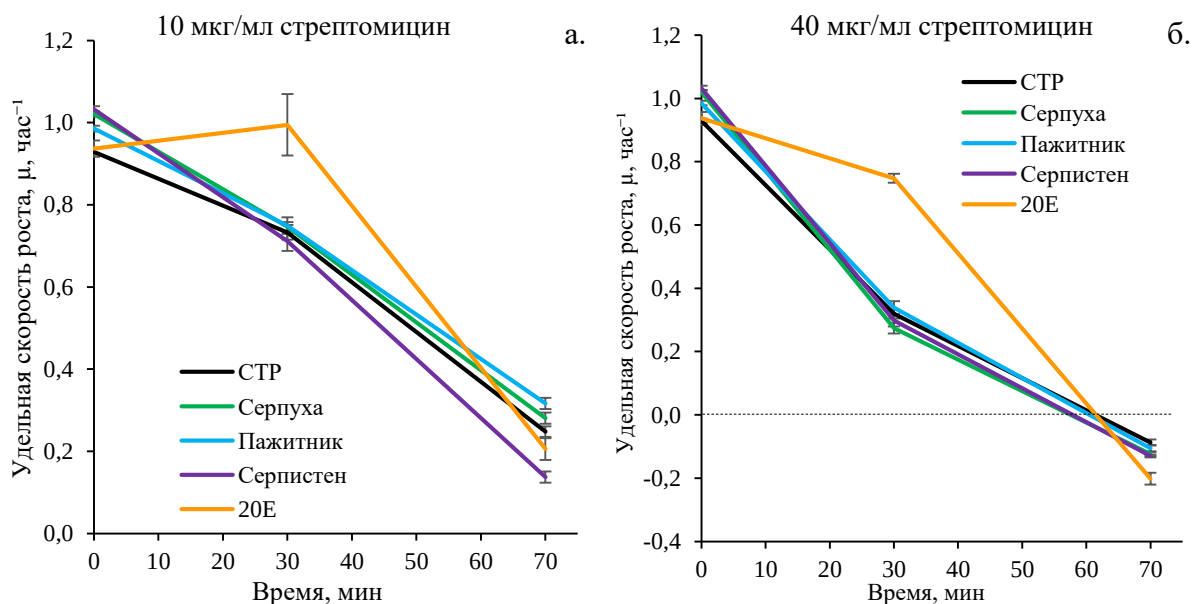


Рисунок 38. Воздействие препаратов, содержащих экдистероиды, на удельную скорость роста *E. coli* при экспозиции к стрептомицину (СТР).
а – 10 мкг/мл стрептомицина; б – 40 мкг/мл стрептомицина.

Все испытуемые полифенолсодержащие препараты, кроме низких доз ресвератрола и кверцетина, и дипиридил снижали эффективность бактерицидного действия 10 мкг/мл стрептомицина от 2.5 до 100 раз (Рисунок 39а). В случае высокой дозы антибиотика (40 мкг/мл) наиболее существенное протекторное действие оказывала предобработка ресвератролом (100 мкг/мл) и дипиридилом. При этом число КОЕ к концу культивирования возрастало в 750 и 1500 раз соответственно по сравнению с культурой, обработанной одним антибиотиком. Также наблюдалось слабое протекторное действие трансверола, при котором количество КОЕ увеличивалось в 4 раза (Рисунок 39б).

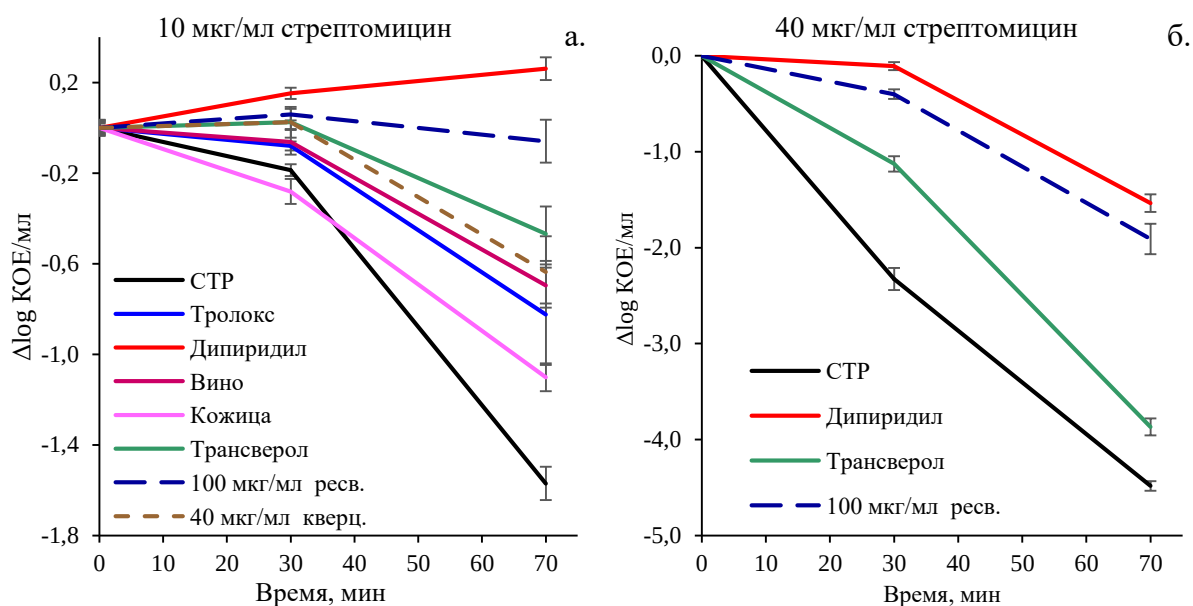


Рисунок 39. Воздействие препаратов, содержащих полифенолы, на колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к стрептомицину (СТР).
а – 10 мкг/мл стрептомицина; б – 40 мкг/мл стрептомицина.

Аналогичный эффект на выживаемость оказывал 20Е при экспозиции к 10 мкг/мл стрептомицина (Рисунок 40а). В этих условиях экстракт серпухи и серпистен, напротив, усиливали действие антибиотика, снижая число КОЕ в 3 и 2.3 раза соответственно. Модифицирующий эффект субстанций при добавлении более высокой дозы стрептомицина был выражен в меньшей степени (Рисунок 40б).

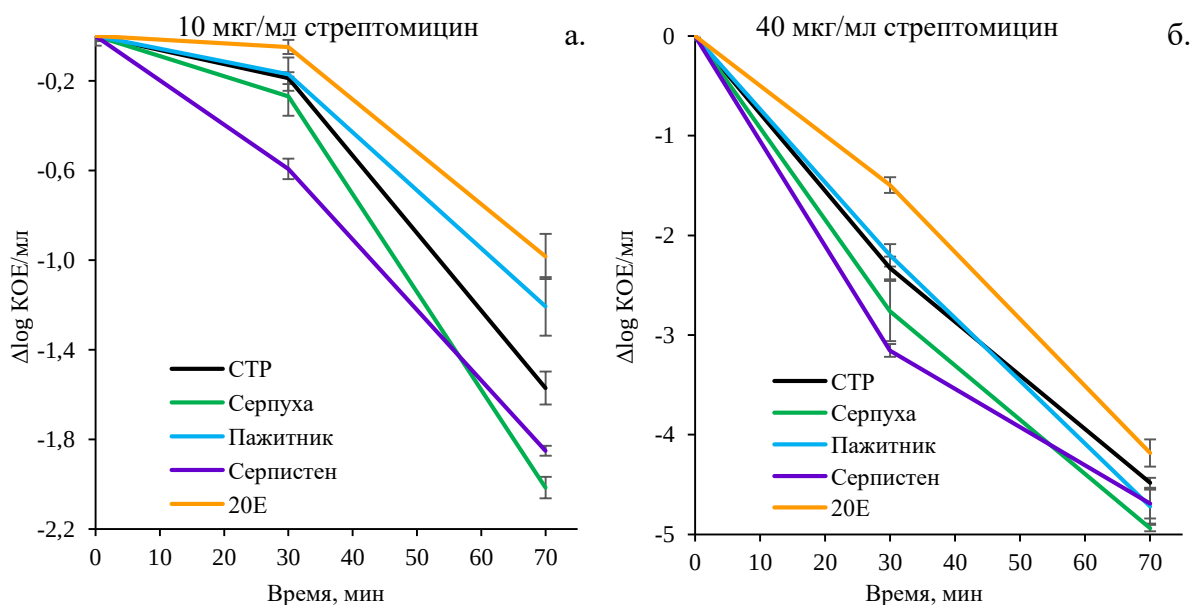


Рисунок 40. Воздействие препаратов, содержащих экидистероиды, на колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к стрептомицину (СТР).
а – 10 мкг/мл стрептомицина; б – 40 мкг/мл стрептомицина.

6.1.4. Влияние исследуемых препаратов на чувствительность *E. coli* к цефотаксиму

Цефотаксим относится к классу β -лактамов, мишенью которых является синтез клеточной стенки бактерий. Присутствие исследуемых полифенол- и экистероидсодержащих препаратов слабо влияло на МИК цефотаксима, которая составляла 0.08 мкг/мл. Обработка экстрактом серпухи, ресвератролом (40 мкг/мл), кверцетином (40 мкг/мл) и трансверолом повышала МИК в 2 раза (Таблица 6).

Добавление цефотаксима в растущие культуры *E. coli* вызывало резкое ингибирование скорости роста и лизис клеток через 23 и 18 мин после внесения в среду дозы 5 и 10 мкг/мл соответственно (Рисунок 41а). При этом колониеобразующая способность *E. coli* зависела от концентрации антибиотика и максимально снижалась в 1270 раз через 70 мин экспозиции к 10 мкг/мл цефотаксима (Рисунок 41б).

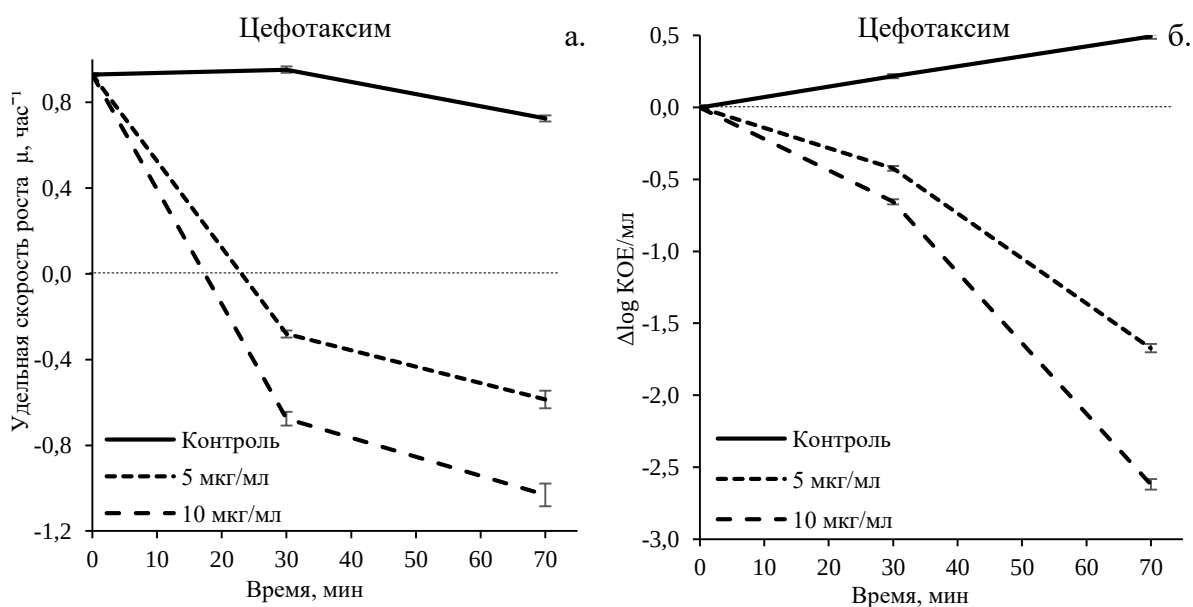


Рисунок 41. Воздействие различных концентраций цефотаксима на *E. coli*.
а – удельная скорость роста; б – колониеобразующая способность.

Среди всех изученных антибиотиков для цефотаксима был характерен наиболее ярко выраженный модифицирующий эффект предобработки исследуемыми субстанциями на рост бактерий. Предобработка *E. coli* всеми полифенолсодержащими препаратами, кроме низкой дозы кверцетина,

полностью предотвращала или существенно замедляла лизис, вызываемый цефотаксимом (Рисунок 42а). Ресвератрол оказывал дозозависимое протекторное действие на удельную скорость роста *E. coli* (Рисунок 42б).

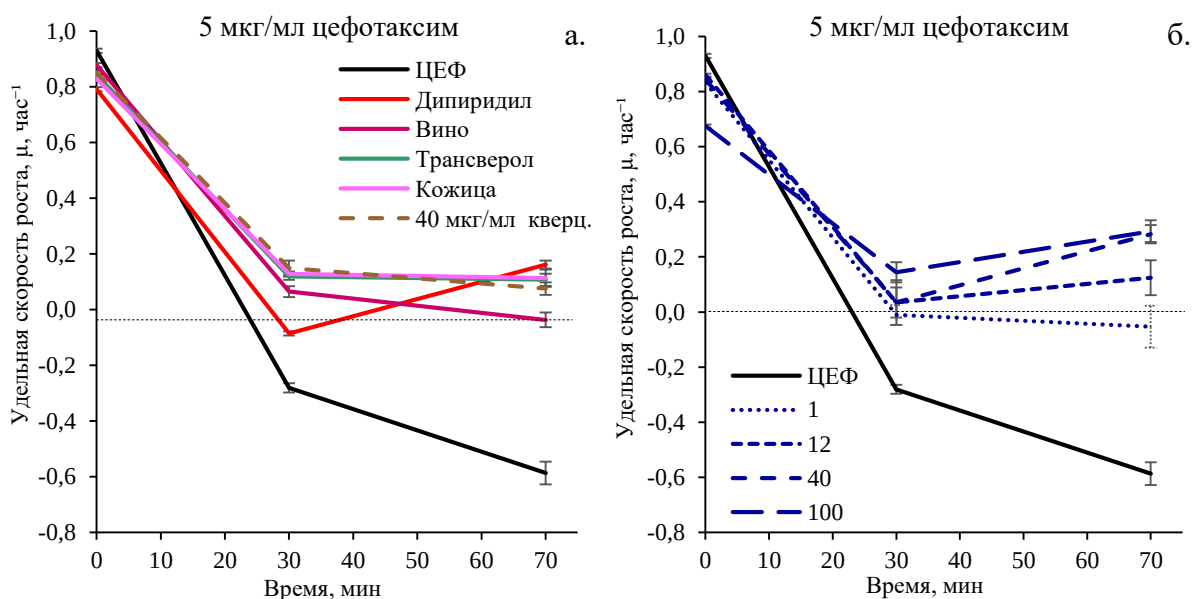


Рисунок 42. Воздействие препаратов на удельную скорость роста *E. coli* при экспозиции к 5 $\mu\text{g/ml}$ цефотаксима (ЦЕФ).

а – препараты, содержащие полифенолы; б – 1-100 $\mu\text{g/ml}$ ресвератрола.

Среди препаратов, содержащих экистероиды, предобработка бактерий серпишеном полностью предотвращала лизис, вызываемый 5 $\mu\text{g/ml}$ цефотаксима, и замедляла его наступление при более высокой дозе антибиотика (Рисунок 43). Остальные экистероидсодержащие субстанции не оказывали существенного влияния на μ .

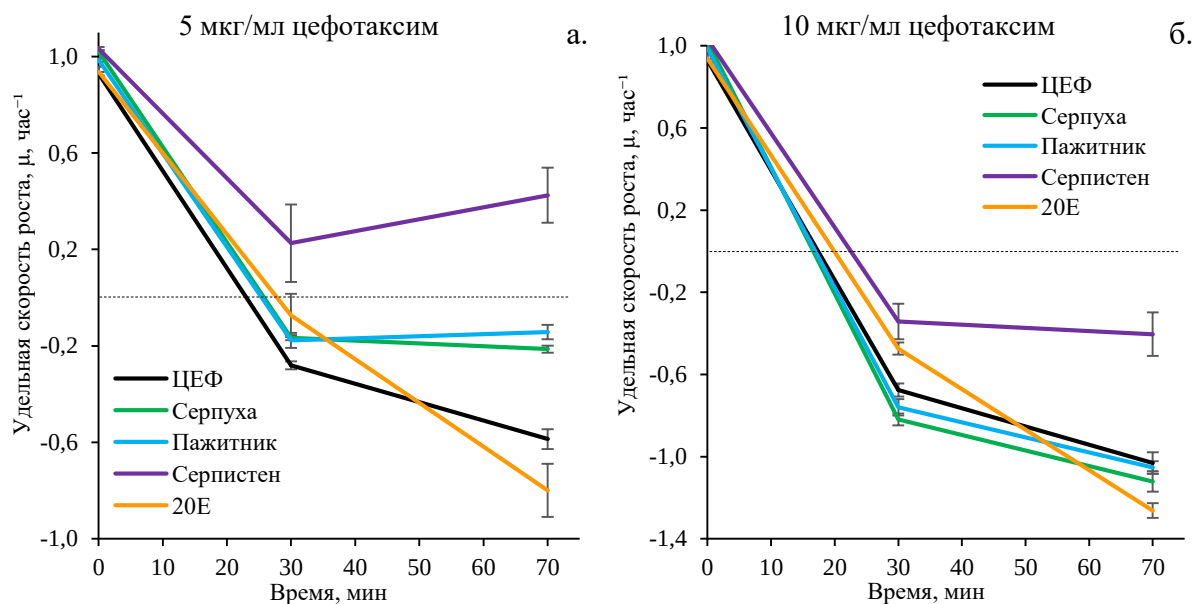


Рисунок 43. Воздействие препаратов, содержащих экидистероиды, на удельную скорость роста *E. coli* при экспозиции к цефотаксиму (ЦЕФ).
а – 5 мкг/мл цефотаксима; б – 10 мкг/мл цефотаксима.

Предобработка бактерий изученными препаратами в различной степени ингибировала бактерицидное действие цефотаксима, повышая способность клеток к образованию колоний. Наиболее выраженный защитный эффект субстанций наблюдался при экспозиции бактерий к дозе цефотаксима 10 мкг/мл , когда присутствие дипиридила и 100 мкг/мл ресвератрола повышало КОЕ в 25 и 34 раза соответственно (Рисунок 44а, б). Остальные из изученных препаратов, кроме тролокса и низких концентраций ресвератрола и кверцетина, увеличивали КОЕ от 3 до 9 раз. Протекторное действие ресвератрола имело дозозависимый характер (Рисунок 44б). При экспозиции бактерий к 10 мкг/мл цефотаксима серпистен повышал КОЕ в 9 раз, относительно культуры, обработанной только антибиотиком (Рисунок 44в). Экстракты серпухи и пажитника оказывали очень слабый протекторный эффект на бактерии. 20Е не влиял на колониеобразующую способность *E. coli* при обеих испытанных концентрациях цефотаксима.

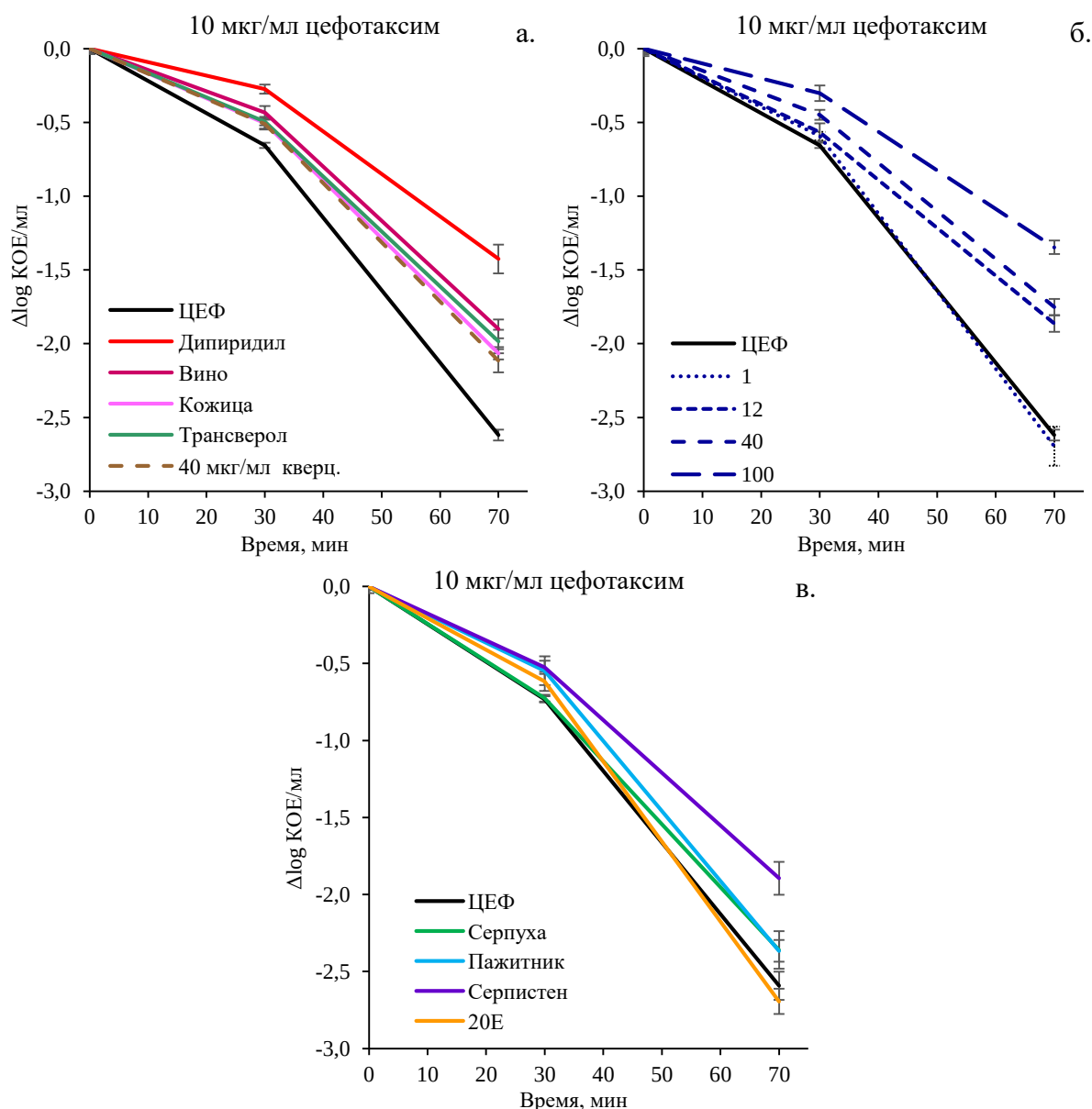


Рисунок 44. Воздействие препаратов на колониеобразующую способность *E. coli* при экспозиции к 10 мкг/мл цефотаксима (ЦЕФ).
а – препараты, содержащие полифенолы; б – 1-100 мкг/мл ресвератрола; в – препараты, содержащие эдикстероиды.

Корреляционный анализ выявил обратную зависимость между удельной скоростью роста бактерий в момент добавления антибиотиков и колониеобразующей способностью при экспозиции ко всем изученным антибиотикам. Коэффициенты корреляции варьировали от - 0.61 до - 0.86, $p < 0.05$. Наиболее сильная связь была обнаружена при экспозиции *E. coli* к 5 мкг/мл цефотаксима и 0.3 и 3 мкг/мл ципрофлоксацина, $r = - 0.86$, - 0.79, - 0.77 соответственно (взято из рисунков 27, 29, 42, 43).

6.2. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию стрессовых регулонов при действии ципрофлоксацина

Для изучения роли антиоксидантных систем при формировании толерантности к антибиотикам был проведен мониторинг экспрессии генов *katG*, *sodA*, *katE*, *rpoS*, *sulA*, принадлежащих к стрессовым регулонам OxyR, SoxRS, RpoS и SOS, при воздействии на бактерии различных концентраций фторхинолона ципрофлоксацина.

Обработка бактерий 0.03 и 0.3 мкг/мл ципрофлоксацина не оказывала значительного влияния на экспрессию слияния *katG::lacZ* в течение 70 мин экспозиции, а доза 3 мкг/мл усиливала экспрессию в 1.5 раза по сравнению с контролем (Рисунок 45а). Наиболее выраженный эффект предобработки субстанциями проявлялся при действии 3 мкг/мл ципрофлоксацина. В культурах, растущих с добавлением трансверола и 40 мкг/мл кверцетина, уровень экспрессии был на 21-25% ниже по сравнению с клетками, обработанными только антибиотиком. Напротив, в культурах, предобработанных 12 мкг/мл ресвератрола и экстрактом вина, экспрессия слияния была на 21-28% выше (Рисунок 45б). Экстракты серпухи и пажитника также повышали активность β -галактозидазы в 1.7 и 2 раза соответственно, по сравнению с клетками, обработанными только ципрофлоксацином. Серпистен и 20Е не оказывали статистически значимого изменения экспрессии *katG*. Таким образом, обработка бактерий полифенолами и экстрактами, богатыми полифенолами и экидистероидами, в присутствии ципрофлоксацина могла оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее воздействие на экспрессию гена *katG*.

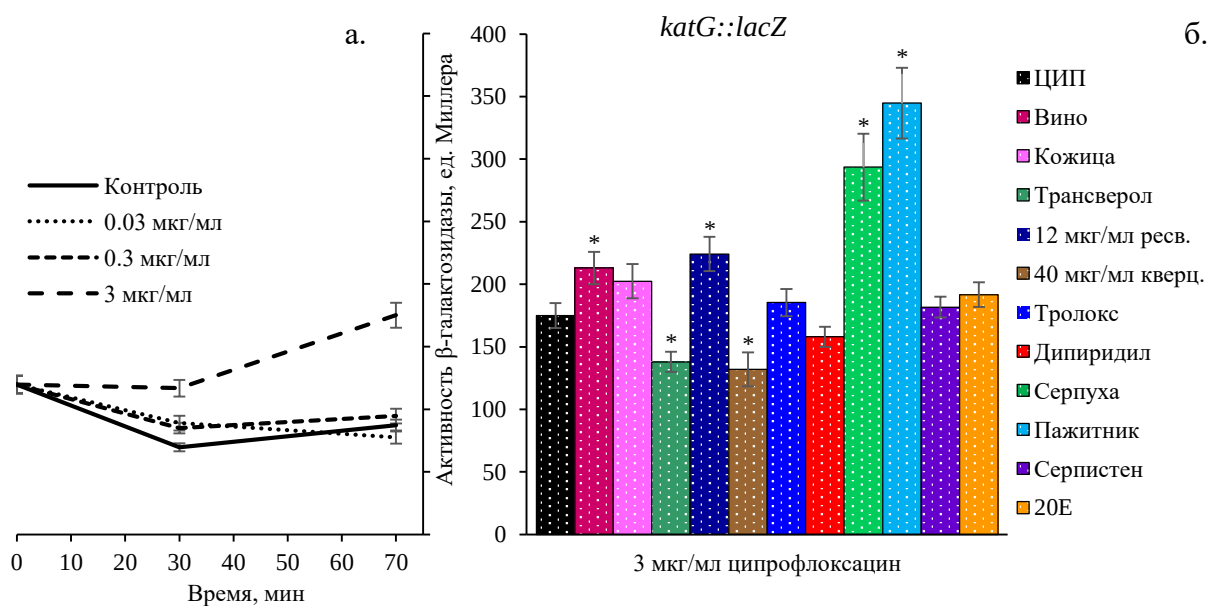


Рисунок 45. Влияние ципрофлоксацина (ЦИП) на экспрессию *katG::lacZ*.
а – 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП; б – экспрессия слияния через 70 мин после добавления 3 мкг/мл ЦИП при культивировании с изучаемыми препаратами.

Добавление ципрофлоксацина в среду культивирования приводило к повышению экспрессии *rpoS::lacZ* до 3.5 раз в случае 3 мкг/мл антибиотика, доза 0.03 мкг/мл не оказывала значительного влияния (Рисунок 46а). Поскольку экспрессия *rpoS* повышается при замедлении роста, полученный результат в целом соответствует степени воздействия ципрофлоксацина на скорость роста бактерий. Предобработка *E. coli* экстрактами виноградной кожицы и вина, трансверолом, 40 мкг/мл кверцетина, 100 мкг/мл ресвератрола и дипиридилем приводила к статистически значимому снижению экспрессии слияния на 19-57% через 70 мин после внесения 0.3 или 3 мкг/мл ципрофлоксацина. При этом тролокс, 1 мкг/мл кверцетина и 1-40 мкг/мл ресвератрола не оказывали значимого эффекта (Рисунок 46б). Среди препаратов, содержащих экдистероиды, только экстракт пажитника влиял на активность β-галактозидазы в клетках, снижая уровень экспрессии в 1.6 и 1.4 раза при экспозиции *E. coli* к 0.3 и 3 мкг/мл ципрофлоксацина соответственно (Рисунок 46в).

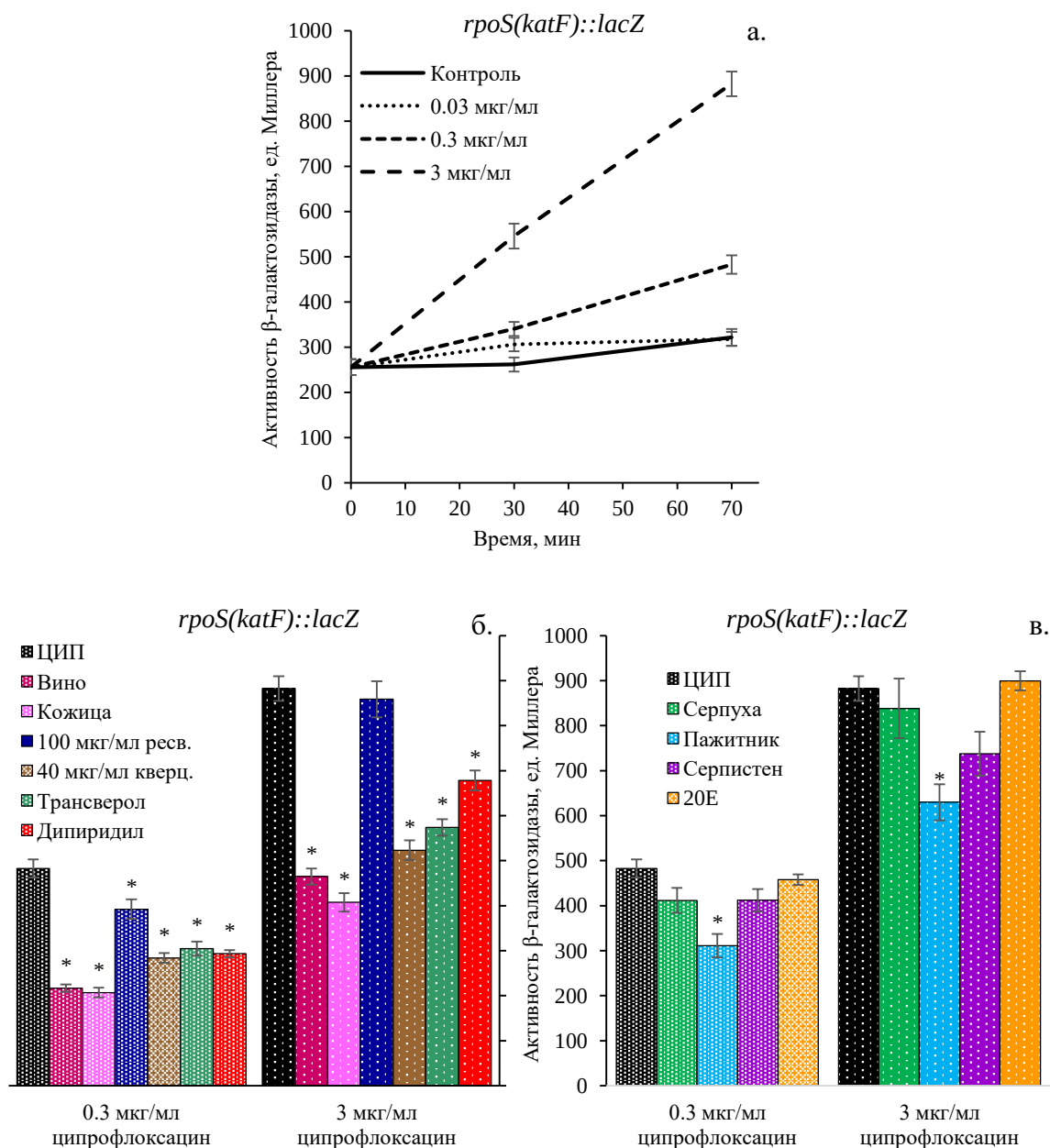


Рисунок 46. Влияние ципрофлоксацина (ЦИП) на экспрессию $rpoS(katF)::lacZ$. а – 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП; через 70 мин после добавления 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП при культивировании с препаратами, содержащими: б – полифенолы, в – экдистероиды.

Следует отметить, что большая часть препаратов, предобработка которыми снижает экспрессию $rpoS$ в ответ на экспозицию к ципрофлоксацину, оказывает защитное действие на рост бактерий. Таким образом, причиной модулирующего действия предобработок на экспрессию $rpoS$ в присутствии высокой дозы ципрофлоксацина может быть их влияние на скорость роста бактерий.

Активность β -галактозидазы в клетках, несущих слияние $katE::lacZ$, в ответ на добавление 0.3 и 3 мкг/мл ципрофлоксацина повышалась в 1.7 и 3.7

раза соответственно, доза 0.03 мкг/мл не влияла на экспрессию *katE* (Рисунок 47а).

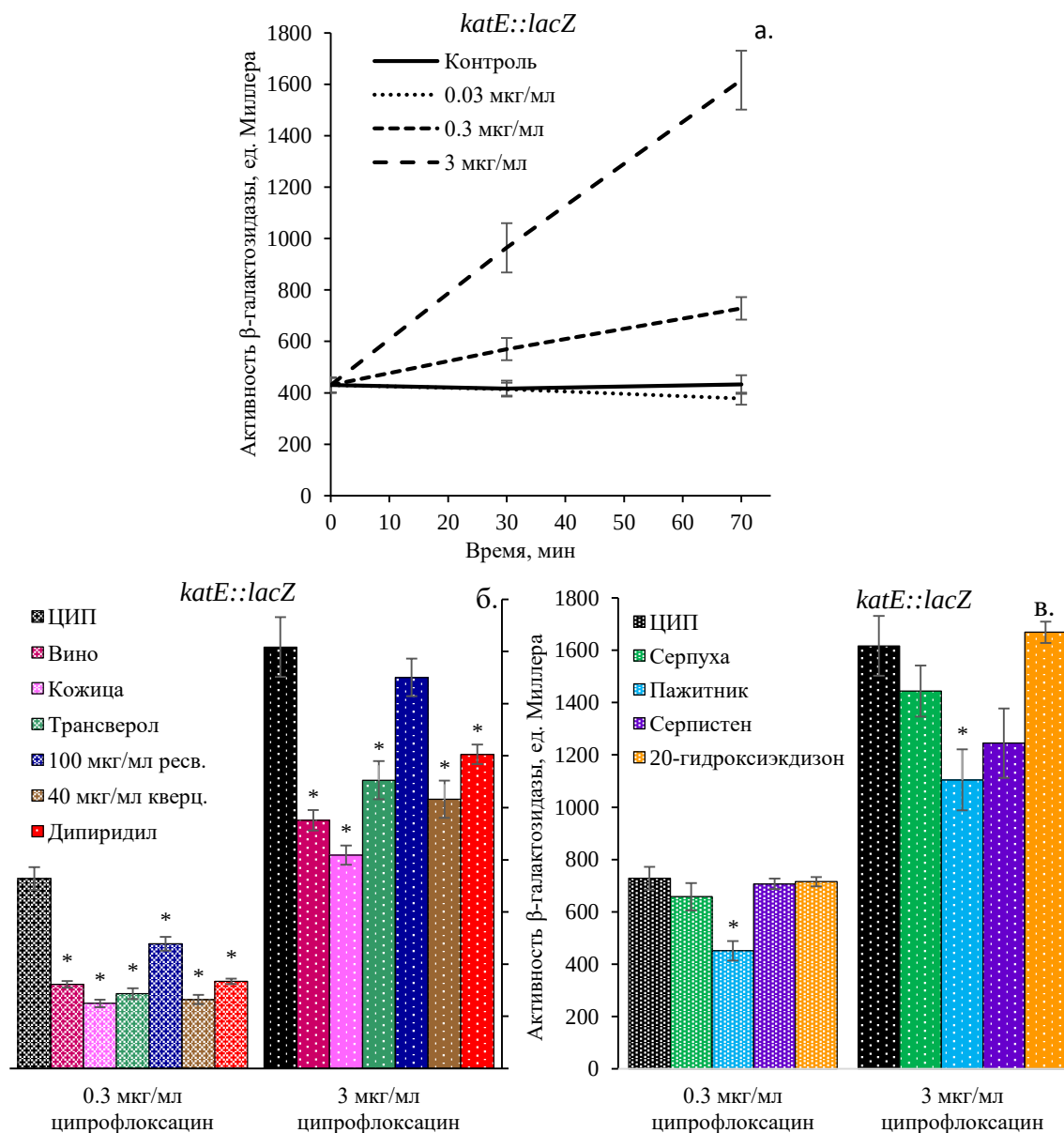


Рисунок 47. Влияние ципрофлоксацина (ЦИП) на экспрессию *katE::lacZ*. а – 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП; через 70 мин экспозиции к 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП при культивировании с препаратами, содержащими: б – полифенолы, в – экидистериоды.

Характер изменения экспрессии изучаемого слияния в клетках, предобработанных испытываемыми препаратами, был аналогичен таковому у бактерий, несущих слияние *rpoS::lacZ* (Рисунок 47б, в). Это может быть следствием того, что ген *katE* находится под контролем регуляторного белка RpoS.

При экспозиции бактерий к ципрофлоксацину, только доза 3 мкг/мл оказывала значительное влияние на экспрессию *sodA::lacZ*, повышая активность β -галактозидазы в клетках в 2.4 раза по сравнению с контрольной культурой (Рисунок 48а). Добавление экстрактов виноградной кожицы, вина, серпухи, пажитника, 40 и 100 мкг/мл ресвератрола, дипиридила и 20-гидроксиэкдизона индуцировало экспрессию слияния на 25-50% через 70 мин после внесения антибиотика (Рисунок 48б). Учитывая, что исследуемые субстанции сами оказывали стимулирующее действие на экспрессию гена *sodA* (Рисунок 21), в этой ситуации наблюдался аддитивный эффект предобработки и антибиотика.

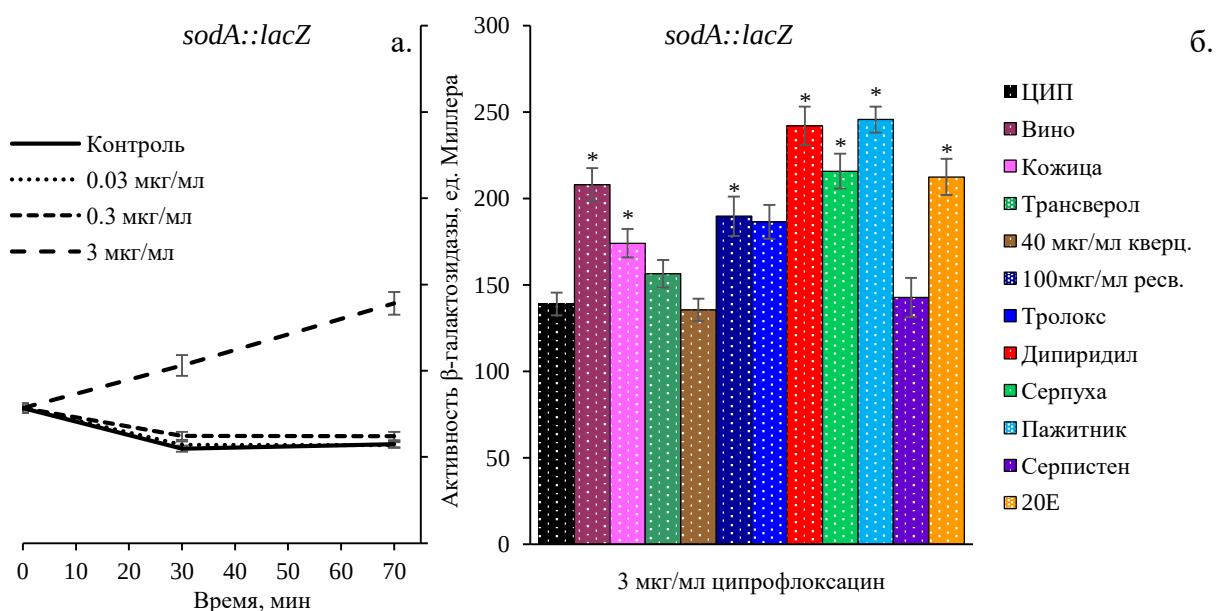


Рисунок 48. Влияние ципрофлоксацина (ЦИП) на экспрессию *sodA::lacZ*. а – 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП; б – экспрессия слияния в культурах, предобработанных изучаемыми препаратами, через 70 мин после добавления 3 мкг/мл ЦИП.

В наших экспериментах ципрофлоксацин, повреждающий ДНК, индуцировал экспрессию принадлежащего к SOS-регулону гена *sulA*. Максимальный уровень индукции (3.3 раза) наблюдался при концентрации антибиотика 0.3 мкг/мл (Рисунок 49а).

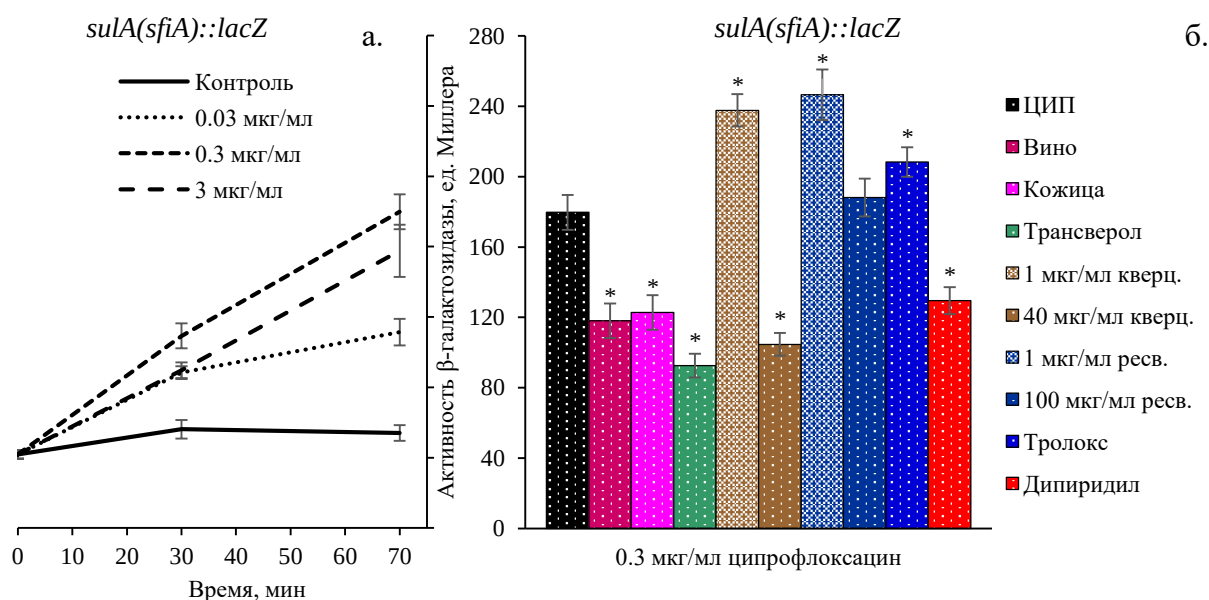


Рисунок 49. Влияние ципрофлоксацина (ЦИП) на экспрессию *sulA(sfiA)::lacZ*.
 а – 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП; б – экспрессия слияния в культурах, предобработанных изучаемыми препаратами, через 70 мин после добавления 0.3 мкг/мл ЦИП.

Предобработка бактерий экстрактами вина и кожицы винограда, 40 мкг/мл кверцетина, трансверолом и дипиридилем снижала активность β-галактозидазы в 1.4-2 раза, тролокс, напротив, усиливал экспрессию слияния к концу экспозиции к 0.3 мкг/мл ципрофлоксацина (Рисунок 49б). Примечательно, что модулирующее влияние ресвератрола и кверцетина зависело как от концентрации самого полифенола, так и антибиотика. При экспозиции бактерий к 0.03 и 0.3 мкг/мл ципрофлоксацина доза 1-40 мкг/мл ресвератрола и 1 мкг/мл кверцетина оказывали аддитивный эффект на экспрессию слияния *sulA(sfiA)::lacZ* (Рисунок 50). В свою очередь высокие концентрации ресвератрола и кверцетина (100 и 40 мкг/мл соответственно) ингибировали экспрессию или не влияли на нее. Однако при увеличении дозы антибиотика до 3 мкг/мл, ресвератрол в зависимости от дозы повышал активность β-галактозидазы в клетках, концентрация 40 мкг/мл кверцетина продолжала ингибировать экспрессию слияния.

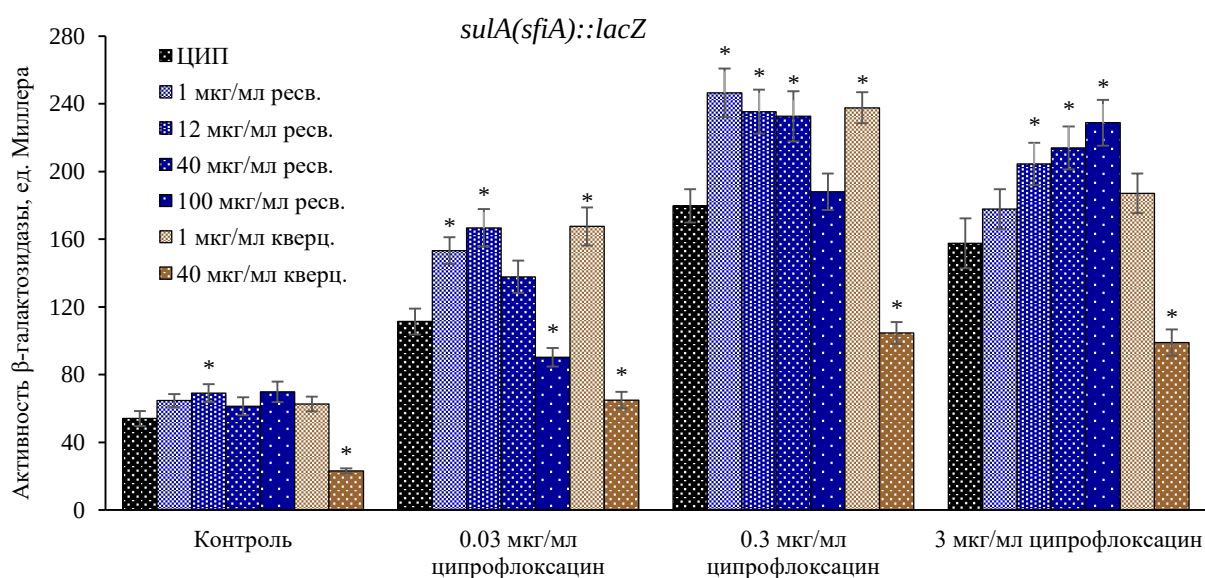


Рисунок 50. Влияние ципрофлоксацина на экспрессию гена *sulA(sfiA)* в культурах, предобработанных ресвератролом и кверцетином через 70 мин экспозиции.

При экспозиции бактерий, культивируемых в присутствии препаратов, содержащих экдистероиды, ко всем изученным концентрациям ципрофлоксацина наблюдалось повышение экспрессии гена *sulA* (Рисунок 51). Наиболее выраженное воздействие наблюдалось через 30 мин экспозиции клеток к 0.03 мкг/мл антибиотика, когда активность β-галактозидазы возрастал в 1.8-2.4 раза по сравнению с культурой, обработанной только антибиотиком (Рисунок 51а). Максимальный уровень индукции наблюдался в культуре, предобработанной 20Е.

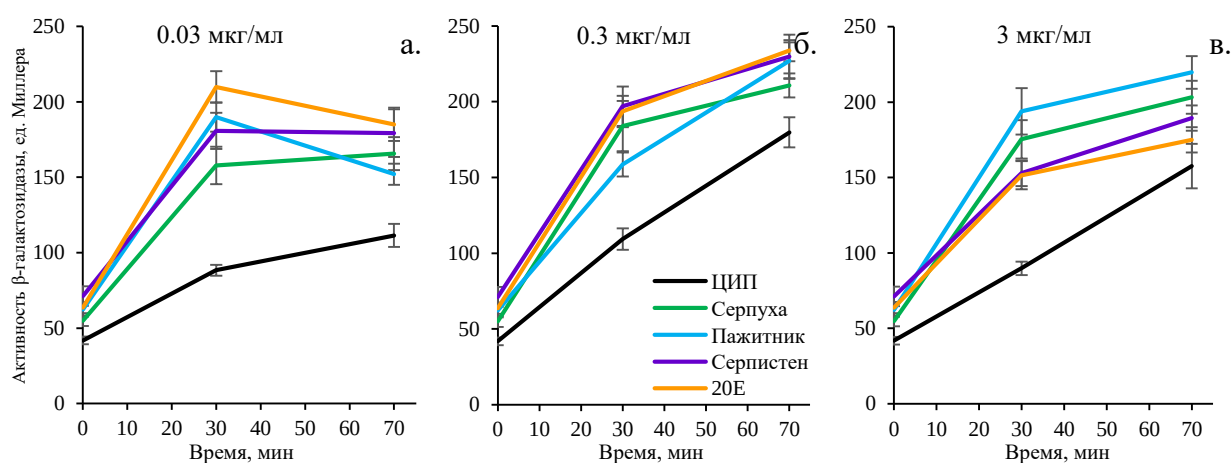


Рисунок 51. Влияние ципрофлоксацина на экспрессию *sulA(sfiA)::lacZ* в культурах, предобработанных препаратами, содержащими экдистероиды.
а – 0.03 мкг/мл; б – 0.3 мкг/мл; в – 3 мкг/мл ципрофлоксацина (ЦИП).

При обработке бактерий 0.3 или 3 мкг/мл ципрофлоксацина стимулирующее действие экистероидсодержащих субстанций было выражено в меньшей степени (Рисунок 51б, в).

Статистический анализ выявил наличие зависимости между экспрессией изучаемых генов в момент добавления ципрофлоксацина и способностью бактерий формировать колонии. Число КОЕ при экспозиции к 0.03 и 0.3 мкг/мл ципрофлоксацина было положительно связано с уровнем индукции антиоксидантных генов *katG* и *sodA* при добавлении фторхинолона. Коэффициент корреляции для гена *katG* варьировал от + 0.52 до + 0.64, для гена *sodA* – от + 0.72 до + 0.77 ($p < 0.05$) (взято из рисунков 18, 21, 28, 29, 30).

Резюмируя представленные в этом разделе данные, следует отметить, что полифенолы оказывают различное модулирующее влияние на бактерии *E. coli* в условиях окислительного стресса и действия антибиотиков разных классов. Антиоксидантный эффект субстанций зависел, с одной стороны, от способности непосредственно тушить АФК за счет радикал-связывающей и хелатирующей активности, с другой стороны, от способности индуцировать гены, принадлежащие к стрессовым регулонам. В свою очередь, модифицирующее действие полифенолсодержащих субстанций при экспозиции *E. coli* к антибиотикам может носить различный характер, зависящий от типа антибиотика, его концентрации и времени экспозиции. Модифицирующий эффект экстрактов может быть связан с суммарным действием полифенолов в их составе. Воздействие экстрактов на клетки осуществляется, по-видимому, путем их влияния на скорость роста бактерий, редокс-ситуацию и уровень индукции антиоксидантных генов. В случае ципрофлоксацина, предобработка экстрактами может снижать степень повреждения ДНК.

Модулирующее влияние экстрактов серпухи и пажитника на бактерии при окислительном стрессе и действии антибиотиков обусловлено в большей степени входящими в их состав полифенолами, чем экистероидами. В свою очередь, противоположные эффекты, наблюдаемые при воздействии 20-

гидроксиэкдизона и серпистена на чувствительность бактерий к стрептомицину и канамицину, могут быть обусловлены содержанием 25S-инокостерона и других минорных экдистероидов, входящих в состав серпистена. Индукция SOS-регулона изученными препаратами, содержащими экдистероиды, может вносить непосредственный вклад в модуляцию восприимчивости *E. coli* к ципрофлоксацину.

ОБСУЖДЕНИЕ

Фенольные соединения, представленные в большом количестве и разнообразии в потребляемой пище, вносят огромный вклад в поддержание здоровья человека, предотвращая развитие патологических процессов, причиной возникновения многих из которых является окислительный стресс (Halliwell, 2006; Watson *et al.*, 2013). Известно, что бактерии, обитающие в кишечнике, подвергаются воздействию относительно высоких концентраций полифенолов и участвуют в их метаболизме, что оказывает существенное влияние как на саму микрофлору, так и на здоровье организма-хозяина в целом (Ginsburg *et al.*, 2011; van Duynhoven *et al.*, 2011; Dueñas *et al.*, 2015; Espín *et al.*, 2017). Высокая антиоксидантная и антипролиферативная активность ряда полифенолов (кверцетин, ресвератрол и др.) обуславливает их широкое использование в составе биологически активных добавок и лекарственных препаратов при профилактике и лечении заболеваний, связанных с окислительным стрессом (рак, диабет, сердечно-сосудистые заболевания и другие). Кроме того, полифенолы являются компонентами экстрактов лекарственных растений, широко применяемых в традиционной медицине и комплексной терапии различных заболеваний.

Проведенные нами исследования показали, что растительные экстракты, биологически активные добавки, а также отдельные фенольные соединения, входящие в их состав, существенно отличаются по антиоксидантным свойствам, определяемым в тестах *in vitro* и *in vivo*. Исследования на бактериях позволили обнаружить среди испытуемых субстанций те, которые способны в значительной степени модифицировать действие перекиси водорода и восприимчивость бактерий к различным антибиотикам.

Известно, что проявляемые экстрактами антиоксидантные свойства во многом зависят от качественного и количественного состава присутствующих в них фенольных соединений (Halliwell, 2006; Han *et al.*, 2007; Gülçin, 2012; Aрак *et al.*, 2013). В свою очередь, антиоксидантная активность полифенолов и фитоэкдистероидов во многом связана с их способностью прерывать

свободно-радикальные реакции и хелатировать ионы металлов с переменной валентностью, ингибируя протекание реакции Фентона (Cai *et al.*, 2002; Nsimba *et al.*, 2008; Terao, 2009; Mamadalieva *et al.*, 2011; Procházková *et al.*, 2011).

Результаты проведенных нами комплексных исследований хорошо согласуются с ранее полученными данными. Изучение АОА экстрактов *in vitro* показало, что вино, отличавшееся максимальным суммарным содержанием полифенолов, имело самую высокую радикал-связывающую активность среди всех испытанных экстрактов. Хелатирующая способность также была лучше выражена в препаратах с более высоким содержанием полифенолов. Однако хелатирующая способность в большей мере зависела от качественного состава полифенолов в испытуемых субстанциях. Так, несмотря на то, что экстракт виноградной кожицы содержал в два раза меньшее количество полифенолов по сравнению с вином, он в 2 раза активнее хелатировал ионы железа. Это может быть связано как с более высоким содержанием в экстракте кожицы активного хелатора кверцетина, так и с преимущественным содержанием в вине полифенолов, имеющих низкую железо-хелатирующую способность или не обладающих ею. В частности, известно, что некоторые фенольные соединения, обнаруженные в составе красных вин (ресвератрол, нарингин, гесперетин) не образуют комплексы с Fe^{2+} (van Acker *et al.*, 1996; Belguendouz *et al.*, 1997). В наших экспериментах ресвератрол также не обладал способностью к связыванию ионов железа. Однако эти полифенолы способны хелатировать другие металлы с переменной валентностью (медь, цинк, алюминий и др.) (Watson *et al.*, 2013), что также может вносить вклад в их антиоксидантное действие. В экспериментах с бактериями экстракты вина и виноградной кожицы, имевшие наибольшее содержание полифенолов и обладавшие высокой радикал-связывающей и хелатирующей активностью, проявляли наиболее выраженную способность снижать бактериостатическое действие перекиси водорода.

Известно, что при определенных условиях (щелочная среда, присутствие кислорода и металлов с переменной валентностью) фенольные соединения могут выступать в качестве прооксидантов, то есть сами участвовать в генерации АФК (Tang, Halliwell, 2010). Это может происходить за счёт частичного восстановления молекул кислорода при аутоокислении полифенолов с образованием преимущественно $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . Кроме того полифенолы могут участвовать в восстановлении металлов с переменной валентностью, поддерживая пул железа или меди в восстановленном состоянии и тем самым способствуя протеканию реакции Фентона с образованием высокотоксичных гидроксильных радикалов. Низкомолекулярные полифенолы легко окисляются и могут проявлять значительную прооксидантную активность, в отличие от этого, полифенолы с высокой молекулярной массой более стабильны и практически не обладают прооксидантными свойствами (Canada *et al.*, 1990; Cao *et al.*, 1997; Galati *et al.*, 2002; Ahmad, 2005; Carochi, Ferreira, 2013; Eghbaliferiz, Iranshahi, 2016).

Установлено, что среди всех фенольных соединений, присутствующих в экстрактах, легче всего подвергаются окислению те, которые имеют в своем составе пирогаллольную и пирокатехольную группы (Waterhouse, Laurie, 2006). Примерами таких соединений являются галловая и кофейные кислоты, эпигаллокатехин галлат, кверцетин и др., которые были обнаружены нами в составе изучаемых экстрактов и в наибольшем количестве и разнообразии представлены в вине. В соответствие с этим, в наших экспериментах вино и кверцетин проявляли максимальную способность к продукции перекиси водорода. Образующиеся при аутоокислении низкие дозы АФК, способны индуцировать антиоксидантные ферменты, в первую очередь каталазу и супероксиддисмутазу (Halliwell, Whiteman, 2004; Halliwell, 2008; Smirnova *et al.*, 2009, 2010; Oktyabrsky *et al.*, 2009; Procházková *et al.*, 2011; López-Alarcón, Denicola, 2013). Ранее было обнаружено, что микромолярные концентрации H_2O_2 достаточны для активации транскрипционного фактора OxyR, вызывающего индукцию подконтрольных генов, включая *katG* (Aslund *et al.*,

1999; Seaver, Imlay, 2004; Smirnova *et al.*, 2009). Это было подтверждено в наших экспериментах, показавших, что субстанции с высоким уровнем полифенолов продуцируют H_2O_2 и вызывают индукцию гена *katG*. Наблюдалась очень высокая корреляция между суммарным содержанием полифенолов в экстрактах и уровнем индукции гена *katG* ($r = + 0.98$, $p < 0.05$). Вместе с тем известно, что наряду с OxyR экспрессия *katG* находится под контролем другого транскрипционного фактора RpoS, активность которого возрастает при снижении скорости роста и вхождении в стационарную фазу (Ivanova *et al.*, 1994; Ihssen, Egli, 2004; Potrykus *et al.*, 2011). Поскольку многие из исследуемых нами субстанций в той или иной степени ингибировали рост, повышение экспрессии *katG* могло осуществляться и под контролем RpoS. Однако существенный вклад этого механизма маловероятен, поскольку в наших экспериментах не наблюдалось повышения экспрессии гена *rpoS* и подконтрольного ему гена *katE* при обработке клеток *E. coli* исследуемыми препаратами.

Наряду с повышением экспрессии *katG::lacZ*, в присутствии экстрактов происходила индукция слияния *sodA::lacZ*. Ген *sodA*, кодирующий Mn-зависимую супероксиддисмутазу, контролируется несколькими глобальными транскрипционными регуляторами (ArcAB, Fnr, SoxRS, MarRAB, Fur и IHF), вклад каждого из которых определяется условиями окружающей среды (Touati, 1997). В присутствии соединений, продуцирующих супероксидный радикал, экспрессия *sodA* положительно регулируется системой SoxRS. Одновременно с этим *sodA* репрессируется белком Fur (регулятор генов, участвующих в ассимиляции железа), и присутствие в среде хелаторов железа инактивирует репрессию, вызванную Fur (Hassan, Sun, 1992). Повышение экспрессии *sodA* в присутствии экстрактов могло быть вызвано совокупностью обоих факторов: образованием $O_2^{\cdot-}$ в процессе аутоокисления полифенолов и связыванием железа за счет их хелатирующих свойств (Waterhouse, Laurie, 2006; Smirnova *et al.*, 2009). Действительно, в наших экспериментах экстракты вина и кожицы винограда, имевшие наибольшую

способность к аутоокислению и хелатированию Fe^{2+} , вызывали максимальную экспрессию гена *sodA*. Как и в случае гена *katG*, наблюдалась очень высокая корреляция между суммарным содержанием полифенолов в экстрактах и уровнем индукции гена *sodA* ($r = + 0.98$, $p < 0.05$).

В наших тестах экидистероид 20Е проявлял достаточно высокую радикал-связывающую и хелатирующую активность, однако практически не подвергался аутоокислению с образованием H_2O_2 . 20Е также не вызывал индукцию генов *katG* и *sodA*, что указывает на ведущую роль генерируемых при аутоокислении АФК в повышении экспрессии антиоксидантных генов. Прооксидантные свойства экстрактов серпухи и пажитника, содержащих фитоэкидистероиды, и способность этих экстрактов индуцировать гены *katG* и *sodA*, по-видимому, обусловлены входящими в их состав фенольными соединениями.

Проверка антиоксидантного действия исследуемых субстанций, основанная на определении их способности защищать бактерии от окислительного стресса, индуцированного добавлением H_2O_2 , показала, что основными протекторными механизмами на уровне клеток являются индукция антиоксидантных систем и хелатирование металлов с переменной валентностью. Радикал-связывающая активность, по-видимому, играет меньшую роль, поскольку предобработка бактерий тролоксом, ресвератролом и 20Е, обладающими высокой способностью к связыванию радикалов, но низкой хелатирующей и прооксидантной активностью, не приводила к повышению АОА при пероксидном стрессе.

Ранее было показано, что многие фенольные соединения могут оказывать цитотоксическое воздействие на разные типы клеток, способны нарушать структуру мембран, работу генетического аппарата, ингибировать активность β -лактамаз и др. (Ohshima *et al.*, 1998; Yen *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Bernal *et al.*, 2010; Eumkeb *et al.*, 2010; Lambert, Elias, 2010, Subramanian *et al.*, 2016). В связи с наличием таких свойств отдельные полифенолы, например, ресвератрол и кверцетин, предлагалось использовать

в качестве антимикробных агентов в борьбе с устойчивыми к антибиотикам патогенными микроорганизмами. Установлено в частности, что кверцетин может обратимо реагировать с АТР-связывающим сайтом D-аланил–D-аланин лигазы, ингибируя синтез клеточной стенки бактерий (Wu *et al.*, 2008). Кверцетин способен также повреждать ДНК, ингибируя ДНК-гиразу двумя параллельными механизмами, один из которых подобен действию хинолонов и основан на стабилизации комплекса фермент-ДНК, второй – на конкуренции за АТР-связывающий сайт β -субъединицы ДНК-гиразы (Plaper *et al.*, 2003). Показано, что ресвератрол может вызывать сайт-специфические окислительные повреждения мембран, приводящие к образованию активных альдегидов, потенцирующих гибель клеток (Ahmad *et al.*, 2005; Subramanian *et al.*, 2014). Также был предложен механизм индуцированного ресвератролом повреждения ДНК, основанный на его способности связывать ионы меди с образованием медь-пероксидных комплексов. Различные повреждения ДНК вызывают индукцию SOS-регулона, ответственного за процессы репарации. Способность кверцетина и ресвератрола индуцировать экспрессию SOS-генов, по-видимому, сильно зависит от степени повреждения ДНК, которая определяется дозой и продолжительностью воздействия полифенола. Hwang и Lim (2015) показали, что ресвератрол в дозе от 228 мкг/мл и выше индуцирует *sulA::lacZ* и препятствует образованию Z-кольца у *E. coli* путем подавления экспрессии FtsZ. Однако другие исследователи не наблюдали значимой индукции этого гена при обработке клеток ресвератролом (Subramanian *et al.*, 2016). В наших условиях обработка *E. coli* кверцетином не приводила к повышению экспрессии *sulA*, а ресвератрол лишь слабо индуцировал этот ген. По-видимому, используемые в нашей работе концентрации полифенолов и временные интервалы экспозиции были недостаточны для возникновения существенных повреждений ДНК, хотя наблюдалось зависящее от дозы подавление скорости роста бактерий. Subramanian с соавт. (2016) показали, что значительное повреждение плазмидной ДНК происходило только при продолжительной (6 часов и более) экспозиции к 365 мкг/мл ресвератрола.

При нормальной диете достижение таких высоких концентраций ресвератрола в кишечнике весьма проблематично, поскольку требует потребления огромных количеств продуктов, в которых ресвератрол обычно присутствует в нано- и микромолярных концентрациях. Исследования на мышах и человеке показали, что ресвератрол быстро абсорбируется в кишечнике и уже через 4 часа не обнаруживается в плазме крови, хотя продолжает присутствовать в тканях внутренних органов. Кверцетин абсорбируется медленнее (около 4 часов), а период полувыведения составляет 11 часов (Aggarwal, Shishodia, 2005; Moon *et al.*, 2008). Однако в настоящее время на фармацевтическом рынке присутствует большое разнообразие биодобавок на основе чистых полифенолов, в которых действующие вещества содержатся в больших количествах и при употреблении в пищу могут достигать значительных концентраций в кишечнике.

Механизм действия экдистероидов довольно подробно изучен для клеток насекомых, в меньшей степени для млекопитающих, при этом практически отсутствуют данные о влиянии экдистероидов на бактерии. Было показано, что экдистероиды, выделенные из растений, в том числе 20-гидроксиэкдизон, не проявляют антимикробной активности по отношению к большинству стандартных тест-культур микроорганизмов, включая *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* и условно-патогенные микроорганизмы (*P. aeruginosa*) (Shirshova *et al.*, 2006; Mamadalieva *et al.*, 2011). Известно, что 20Е и другие экдистероиды могут вызывать фрагментацию ДНК и индуцируют программируемую клеточную смерть у насекомых (Iga *et al.*, 2007; Nyamoita, 2013). По-видимому, наблюдаемое нами повышение экспрессии гена *sulA* в культурах *E. coli*, обработанных препаратами, содержащими экдистероиды, также может быть вызвано повреждениями ДНК, приводящими к индукции SOS-ответа. Серпистен, представляющий собой смесь 20Е и минорных экдистероидов, таких как 25S-инокостерон (Володина и др., 2010), вызывал более высокую степень индукции *sulA* по сравнению с чистым 20Е, что может быть обусловлено комплексным эффектом всех экдистероидов. Ранее было

показано, что экстракты *R. carthamoides*, содержащие всю сумму экидистероидов, также обладают значительно более высокой активностью при минимальных дозах по сравнению с высокоочищенными препаратами мажорных экидистероидов (Тимофеев, 2006).

В последние годы в научном сообществе активно дискутируется гипотеза об окислительном стрессе как едином механизме гибели клеток при действии антибиотиков с различными внутриклеточными мишенями (Kohanski *et al.*, 2007; Liu, Imlay, 2013; Keren *et al.*, 2013; Ezraty *et al.*, 2013; Dwyer *et al.*, 2015). Сторонниками этой гипотезы показано, что вслед за эффектом на первичные мишени бактерицидные антибиотики разных классов вызывают накопление окислительных повреждений во всех типах макромолекул (ДНК, белки, липиды), что является причиной гибели бактериальных клеток (Belenky *et al.*, 2015). Антиоксиданты глутатион, аскорбиновая кислота, тиомочевина и хелатор дипиридил модифицировали действие хинолонов, аминогликозидов и β -лактамов, снижая бактерицидный эффект антибиотиков (Goswami *et al.*, 2006, 2007; Goswami, Jawali, 2007; Kohanski *et al.*, 2007; Wang, Zhao 2009). Исходя из этой гипотезы, можно предположить, что при одновременном применении, воздействие на бактерии полифенолов, обладающих антиоксидантными свойствами, может интерферировать с действием антибиотиков, влияя тем самым на эффективность антибиотикотерапии. В наших экспериментах предобработка исследуемыми субстанциями существенно модифицировала чувствительность бактерий к антибиотикам разных классов. Эффекты в значительной степени зависели от типа предобработки, вида и дозы антибиотика, а также от определяемого параметра (МИК, удельная скорость роста или колониеобразующая способность). Обобщенные данные, характеризующие направление модифицирующего воздействия (усиление или снижение восприимчивости к антибиотику), представлены в таблице 7.

Таблица 7. Влияние препаратов на МИК, удельную скорость роста и колониобразующую способность *E. coli* при действии антибиотиков.

Антибиотик Препарат	Канамицин					Стрептомицин					Ципрофлоксацин							Цефотаксим				
	МИК	Удельная скорость роста		КОЕ		МИК	Удельная скорость роста		КОЕ		МИК	Удельная скорость роста			КОЕ			МИК	Удельная скорость роста		КОЕ	
		10	40	10	40		10	40	10	40		0.03	0.3	3	0.03	0.3	3		5	10	5	10
Вино	↑					↑			↑		↑				↑	↑	↑		↑		↑	↑
Виноградная кожица		↓	↓		↓		↓	↓	↑		↑				↑	↑	↑		↑		↑	↑
Трансверол	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑
1 мкг/мл кверцетин					↓										↓						↑	
40 мкг/мл кверцетин	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑		↑			↑	↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑
1 мкг/мл ресвератрол					↓									↓	↓				↑		↑	
12 мкг/мл ресвератрол				↑					↑										↑		↑	↑
40 мкг/мл ресвератрол		↑		↑					↑		↑				↑			↑	↑		↑	↑
100 мкг/мл ресвератрол	↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑				↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑
Серпуха	↑		↓	↓	↓	↑			↓						↑			↑				↑
Пажитник	↑		↓	↓	↓	↑									↑							↑
Серпистен		↓	↓	↓	↓				↓										↑	↑		↑
20-гидроксиэкдизон	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑					↑	↓	↑	↑					
Тролокс				↑																		
Дипиридил	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑			↓	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑

Стрелками обозначено ингибирующее (↓) или стимулирующее (↑) влияние препарата на исследуемый параметр.

Пустые клетки – отсутствие эффекта. Цифрами обозначена концентрация антибиотика в мкг/мл.

Из данных таблицы видно, что предобработка высокими дозами кверцетина (40 мкг/мл) и ресвератрола (100 мкг/мл), трансверолом и дипиридилем повышала МИК и выживаемость *E. coli* при экспозиции ко всем исследованным антибиотикам. Тролокс оказывал протекторное действие только в случае канамицина (10 мкг/мл), не влияя на эффект остальных антибиотиков. 20Е не изменял чувствительность к цефотаксиму, усиливал эффект низкой дозы ципрофлоксацина (0.03 мкг/мл) и повышал толерантность к канамицину, стрептомицину и высоким дозам ципрофлоксацина. Растительные экстракты, представляющие собой сложные многокомпонентные смеси, производили различный модифицирующий эффект в зависимости от вида антибиотика. Вино, экстракты виноградной кожицы, серпухи и пажитника защищали бактериальные клетки от бактерицидного действия ципрофлоксацина и цефотаксима. При этом все перечисленные субстанции, за исключением вина, и серпистен могли усиливать антибактериальное действие аминогликозидов канамицина и стрептомицина. Следует отметить различие в эффектах высоких и низких доз кверцетина и ресвератрола. В отличие от высоких концентраций, которые проявляли протекторные свойства, низкие дозы этих полифенолов усиливали эффект канамицина и ципрофлоксацина.

Хотя работы в этой области немногочисленны и ведутся относительно недавно, разнонаправленное модулирующее влияние растительных экстрактов на чувствительность к антибиотикам показано для бактерий *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* и *S. typhi* (Sousa *et al.*, 2011; Smirnova *et al.*, 2012, Samoilova *et al.*, 2014; Marathe *et al.*, 2013). Различный характер модифицирующего воздействия исследуемых субстанций на антибактериальную активность антибиотиков разных классов указывает на возможность участия в этом процессе как общих, так и специфических механизмов, связанных с эффектом на конкретные мишени каждого их тестируемых антибиотиков.

В качестве общего механизма можно рассматривать возможность снижения индуцированных антибиотиками окислительных повреждений бактериальных клеток в присутствии субстанций. В пользу антиоксидантного механизма влияния субстанций и, соответственно, в поддержку окислительной гипотезы бактерицидного действия антибиотиков может свидетельствовать снижение бактерицидного эффекта всех антибиотиков в культурах, предобработанных высокими дозами мощных антиоксидантов кверцетина и ресвератрола. Наши эксперименты также подтверждают данные о протекторном действии хелатора дипиридила, способного снижать уровень внутриклеточного редокс-активного железа и продукцию гидроксильных радикалов в реакции Фентона (Kohanski *et al.*, 2007). Однако отсутствие протекторного действия другого мощного антиоксиданта тролокса, а также избирательное и разнонаправленное влияние 20-гидроксиэкдизона, растительных экстрактов и низких доз кверцетина и ресвератрола указывает на то, что антиоксидантные свойства субстанций не являются определяющими. Анализ связи между вызванной субстанциями индукцией антиоксидантных генов и выживаемостью *E. coli* в присутствии антибиотиков выявил наличие статистически значимой прямой корреляции только в случае низких доз ципрофлоксацина ($r = + 0.64$ для гена *katG* и $+ 0.77$ для гена *sodA*). При повышении дозы ципрофлоксацина и при экспозиции к другим антибиотикам корреляция отсутствовала.

Существенный вклад в модуляцию восприимчивости бактерий к антибиотикам может вносить способность полифенолов ингибировать АТФ-синтазу. Известно, что кверцетин, ресвератрол, куркумин и др. полифенолы обратимо связываются с субъединицами домена F₁ АТФ-синтазы *E. coli* (Dadi, *et al.*, 2009; Chinnam *et al.*, 2010; Sekiya *et al.*, 2012). В зависимости от строения молекулы полифенола это приводит к частичному или полному ингибированию активности комплекса. Результатом этих событий может быть наблюдаемое нами ингибирование дыхания, изменение потока ионов калия и снижение мембранного потенциала в культурах, обработанных кверцетином и

ресвератролом. Такими изменениями может быть обусловлено повышение устойчивости *E. coli* к антибиотикам, поскольку известно, что энергия переноса электронов и гидролиза АТФ используется в транспорте молекул антибиотика в клетку (Chapman, Georgoparakou, 1988; Becker, Cooper, 2013).

Другим общим механизмом протекторного действия исследованных нами субстанций может быть их ингибирующее влияние на скорость роста бактерий. В пользу этого свидетельствует выявленная нами обратная корреляция между μ в момент добавления антибиотиков и колониеобразующей способностью бактерий при экспозиции ко всем изученным антибиотикам. Коэффициенты корреляции варьировали от - 0.61 до - 0.86, $p < 0.05$. Наиболее сильная связь была обнаружена при экспозиции *E. coli* к 5 мкг/мл цефотаксима и 0.3 и 3 мкг/мл ципрофлоксацина ($r = - 0.86$, - 0.79, - 0.77 соответственно). Среди всех изученных субстанций высокие дозы кверцетина и ресвератрола, также, как и дипиридил, вызывали максимальное снижение удельной скорости роста. Ранее было показано, что другой мощный антиоксидант глутатион может оказывать протекторное действие против ципрофлоксацина и ампициллина не за счет своих антиоксидантных свойств, а путем ингибирования скорости роста бактерий (Smirnova *et al.*, 2016). Известно, что устойчивость к различным классам антибиотиков возрастает при снижении удельной скорости роста (Tuomanen *et al.*, 1986; Eng *et al.*, 1991; Greulich *et al.*, 2015; Смирнова и др., 2016; Smirnova *et al.*, 2016). Это может быть связано как с уменьшением количества мишеней для антибиотиков в медленно растущих клетках, так и с индукцией защитных механизмов, в том числе под контролем гуанозинтетрафосфата (ppGpp), являющегося глобальным регулятором клеточного метаболизма. Известно, что внутриклеточная концентрация ppGpp находится в обратной линейной зависимости от скорости роста (Potrykus *et al.*, 2011). Среди прочих механизмов, обеспечивающих толерантность бактерий в стационарной фазе, ppGpp контролирует токсин-антитоксиновые системы, способствующие

образованию клеток-персистеров, устойчивых ко многим антибиотикам (Maisonneuve, Gerdes, 2014).

Еще одним общим механизмом модифицирующего влияния исследуемых субстанций на чувствительность бактерий к антибиотикам может быть их способность воздействовать на индукцию SOS-ответа. Известно, что наряду с хинолонами и другими ДНК-повреждающими агентами, SOS-ответ индуцируют аминогликозиды и β -лактамы (Lewin, Amyes, 1991; Miller *et al.*, 2004; Kohanski *et al.*, 2007; Drlica *et al.*, 2008). Показано, что вызванная антибиотиками гибель бактериальных клеток опосредуется SOS-системой и может рассматриваться как экстремальный SOS-ответ (Dwyer *et al.*, 2012; Erental *et al.*, 2014). Установлено также, что контролируемое регулятором SOS-ответа RecA торможение дыхания и падение мембранного потенциала при действии ципрофлоксацина способствует повышению выживаемости бактерий (Smirnova *et al.*, 2017). В наших экспериментах 20Е и все препараты, содержащие экдистероиды, вызывали повышение экспрессии SOS-контролируемого гена *sulA*, а тролокс, ресвератрол и кверцетин модифицировали индукцию этого гена, вызванную ципрофлоксацином. Таким образом, модификация SOS-ответа, индуцированного антибиотиками, в присутствии изучаемых нами субстанций могла вносить вклад в их влияние на толерантность бактерий к антибиотикам.

Неспецифический протекторный эффект дипиридила и других субстанций, обладающих хелатирующей активностью, мог быть связан не только со способностью ингибировать реакцию Фентона, но и с активацией защитных систем клетки. Для бактерии *Acinetobacter baumannii*, являющейся возбудителем многих внутрибольничных инфекций, показано, что дефицит железа вызывает активацию экспрессии генов, кодирующих резистентность к антибиотикам (Eijkelkamp *et al.*, 2011; Fiester, Actis, 2013). Дефицит железа в среде индуцировал экспрессию одного из семейств генов (resistance-nodulation-division, RND), кодирующих белки множественной лекарственной устойчивости, которые используют протон-движущую силу для выброса

антибиотиков из клетки (Poole, 2002). Это повышало устойчивость бактерий к аминогликозидам, β -лактамам, хлорамфениколу, эритромицину и тетрациклину (Magnet *et al.*, 2001). С другой стороны, известно, что дипиридил приводит к индукции гена *rob*, которая не зависит от его железохелатирующей способности (Rosner *et al.*, 2002). Белок Rob является транскрипционным активатором генов множественной лекарственной устойчивости, участвует в регуляции системы экспорта различных ксенобиотиков (AcrAB) и входит в состав *mar-sox-rob* регулона, обеспечивающего устойчивость к различным стрессорам (Ariza *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 2003; Chubiz *et al.*, 2012).

Кроме неспецифических, возможны специфические механизмы воздействия исследуемых субстанций, связанные с их влиянием на первичные мишени конкретных антибиотиков. Мишенью фторхинолона ципрофлоксацина являются ферменты ДНК-гираза и ДНК-топоизомераза IV (Smith, Lewin, 1988; Drlica *et al.*, 2008). Показано, что кверцетин также обладает способностью к образованию комплексов с ДНК-гиразой (Plaper *et al.*, 2003). Эффект, наблюдаемый нами при предобработке *E. coli* кверцетином и ресвератролом, зависел как от концентрации полифенолов, так и от дозы ципрофлоксацина. Предобработка низкими концентрациями кверцетина или ресвератрола (1 мкг/мл) усиливала бактерицидный эффект низкой дозы ципрофлоксацина (0.03 мкг/мл). Напротив, повышение концентрации полифенолов значительно защищало бактерии от антибиотика. Возможно, при повышении концентрации кверцетина наблюдается конкурентное взаимодействие за сайт связывания между антибиотиком и кверцетином, и образование комплекса кверцетина с ДНК-гиразой предотвращает ее взаимодействие с ципрофлоксацином, что снижает токсический эффект антибиотика.

Летальной стадией действия аминогликозидов является встраивание в мембрану неправильно упакованных белков и стимуляция входа антибиотиков с использованием энергии переноса электронов и гидролиза

АТФ (Желдакова, 2004; Becker, Cooper, 2013). Модифицирующее влияние изучаемых субстанций может осуществляться путем активации входа аминокликозида за счет повышения проницаемости клеток (усиление бактерицидного действия) или благодаря ингибированию транспорта антибиотика при снижении трансмембранного градиента протонов (ослабление бактерицидного действия). Ранее методом определения МИК антибиотиков была установлена способность растительных экстрактов в несколько раз повышать эффективность аминокликозидов против различных видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая мультирезистентные штаммы *E. coli* и *S. aureus* (Matias *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2015). С использованием теста на определение КОЕ также было показано, что богатые полифенолами экстракты усиливают бактерицидное действие канамицина (Samoilova *et al.*, 2014). В настоящей работе экстракты виноградной кожицы, серпухи, пажитника, серпистен и низкая доза (1 мкг/мл) ресвератрола и кверцетина усиливали бактерицидное действие аминокликозидов канамицина и стрептомицина. Поскольку известно, что многие фенольные соединения, входящие в состав экстрактов, включая кверцетин и ресвератрол, способны влиять на синтез клеточной стенки и целостность мембран (Ahmad *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Subramanian *et al.*, 2016), можно предположить, что в присутствии перечисленных субстанций стимулируется вход аминокликозидов в клетки.

Был предложен механизм защитного действия дипиридила против аминокликозидов альтернативный антиоксидантному (Ezraty *et al.*, 2013). Предполагается, что хелаторы ингибируют работу дыхательной цепи за счет связывания ионов железа, находящихся в Fe-S кластерах в составе дегидратаз, в результате чего снижается проникновение аминокликозида в бактериальную клетку и, соответственно, его эффективность.

Мишень β -лактамов – синтез клеточной стенки (Яковлев и Сидоренко, 1997; Zeng, Lin, 2013). Интенсивное деление клеток является обязательным условием для бактерицидного действия этих антибиотиков, которое строго

пропорционально скорости роста бактерий (Tuomanen *et al.*, 1986). Индукция генов SOS-ответа, наблюдаемая при действии β -лактамов, временно прекращает деление бактериальных клеток, позволяя им выживать при воздействии этих антибиотиков (Miller *et al.*, 2004). Показано, что активация SOS-ответа субингибиторными концентрациями фторхинолонов стимулировала развитие резистентности *Staphylococcus aureus* к β -лактамам (Tattevin *et al.*, 2009). Можно предположить, что в основе протекторного действия большинства из изученных нами субстанций против бактерицидного действия β -лактамов лежит способность полифенолов и экистероидов к взаимодействию с генетическим аппаратом (Hwang, Lim, 2015; Plaper *et al.*, 2003; Iga *et al.*, 2007; Nyamoita, 2013) и к SOS-зависимому или SOS-независимому ингибированию клеточного деления.

В совокупности, результаты наших исследований свидетельствуют о наличии сложных взаимодействий кишечных бактерий с полифенолами и экистероидами в составе растительных продуктов и пищевых добавок. В условиях окислительного стресса и действия антибиотиков модулирующий эффект препаратов может включать несколько перекрывающихся механизмов. Защитное антиоксидантное действие полифенолов при пероксидном стрессе связано в основном с хелатирующей активностью и способностью к индукции антиоксидантных ферментов. Модулирующий эффект субстанций на действие антибиотиков является разнонаправленным и опосредуется совокупностью специфических и неспецифических механизмов, среди которых ведущую роль играет влияние на скорость роста и индукцию защитных систем бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши исследования показали, что предобработка полифенол- и экистероидсодержащими препаратами вызывает значительные изменения активности генов антиоксидантных и стрессовых регулонов и существенно модулирует устойчивость бактерий при стрессах, индуцированных H_2O_2 и антибиотиками. Определяющий вклад в повышение устойчивости *E. coli* к окислительному стрессу вносит хелатирующая активность исследуемых субстанций и их способность к аутоокислению и индукции генов *katG* и *sodA*, кодирующих каталазу HPI и Mn-супероксиддисмутаза. Направление и степень влияния субстанций на чувствительность к антибиотикам зависит от вида и концентрации испытуемого препарата, а также от типа антибиотика, его концентрации и времени экспозиции. Модулирующий эффект, по-видимому, опосредуется совокупностью специфических и неспецифических механизмов, среди которых ведущую роль играет влияние на скорость роста и индукцию защитных систем бактерий. При низких дозах ципрофлоксацина выявлена прямая корреляция между уровнем экспрессии антиоксидантных генов *katG* и *sodA* и колониеобразующей способностью клеток *E. coli*, предобработанных исследуемыми субстанциями. Показана способность полифенол- и экистероидсодержащих субстанций влиять на степень индукции SOS-ответа, вызванного ципрофлоксацином, что указывает на возможность их модулирующего действия на уровне первичной мишени антибиотика.

Полученные результаты вносят вклад в решение актуальной фундаментальной проблемы, связанной с изучением механизмов фенотипической устойчивости бактерий к действию бактерицидных антибиотиков. Модуляция восприимчивости бактерий к антибиотикам с помощью препаратов, содержащих биологически активные соединения, может иметь важное практическое значение при комплексной терапии бактериальных инфекций и разработке новых антимикробных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Проведено качественное и количественное исследование состава полифенол- и экдистероидсодержащих субстанций, определена их антирадикальная, хелатирующая и прооксидантная активность. Максимальные значения по всем трем типам активности зарегистрированы для кверцетина, трансверола и экстрактов вина и кожицы винограда. Ресвератрол не обладал хелатирующей способностью, а 20-гидроксиэкдизон и серпистен не продуцировали H_2O_2 при аутоокислении.
2. Богатые полифенолами препараты и чистые полифенолы оказывали ингибирующее влияние на рост, дыхание и мембранный потенциал бактерий и стимулировали экспрессию генов *katG* и *sodA*. Серпистен и 20-гидроксиэкдизон слабо влияли на рост и индукцию антиоксидантных генов. Антиоксидантное действие субстанций на *E. coli* при пероксидном стрессе было сильнее выражено у препаратов, содержащих полифенолы, и зависело от их способности хелатировать железо и индуцировать гены *katG* и *sodA*.
3. Показано, что все экдистероидсодержащие субстанции индуцируют SOS-ответ в клетках *E. coli*. Наибольший эффект наблюдался при обработке серпистеном, который стимулировал экспрессию *sulA::lacZ* в 3.2 раза по сравнению с контролем.
4. Эффекты исследуемых субстанций на чувствительность бактерий к летальному действию антибиотиков в значительной степени зависели от типа предобработки, вида и дозы антибиотика. Высокие дозы кверцетина и ресвератрола, трансверол и дипиридил повышали толерантность *E. coli* ко всем исследованным антибиотикам. Вино, экстракты виноградной кожицы, серпухи и пажитника защищали клетки от бактерицидного действия ципрофлоксацина и цефотаксима. Напротив, низкие дозы кверцетина и ресвератрола, серпистен и экстракты виноградной кожицы, серпухи и пажитника усиливали бактерицидную активность аминогликозидов.
5. Низкие дозы кверцетина и ресвератрола усиливали бактерицидное действие ципрофлоксацина и SOS-ответ, индуцированный антибиотиком, в то

время как высокие дозы этих полифенолов повышали выживаемость и снижали экспрессию *sulA::lacZ*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алехин, Е.К. Как действуют антибиотики / Е.К. Алехин // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6. – № 4. – С. 19-23.
2. Володина, С.О. Ресурсы, биотехнология и использование экистероидсодержащих растений / С.О. Володина, В.В. Володин, И.Ф. Чадин // Известия Самарского НЦ РАН. – 2010. – Т. 12. – № 1(3). – С. 668-674.
3. Желдакова, Р.А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов / Р.А. Желдакова // Мн.: БГУ, 2004. – 111 с.
4. Костюк, В. А. Биорадикалы и биоантиоксиданты: Монография / В.А. Костюк, А.И. Потапович // Мн.: БГУ, 2004. – 174 с.
5. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.] // М.: «Слово», 2006. – 556 с.
6. Октябрьский, О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – С. 158-174.
7. Селяскин, К.Е. Влияние экстракта *Serratula coronata* на активность апоптоза у крыс / К.Е. Селяскин [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50. – № 5. – С. 33-38.
8. Сидоренко, С.В. Бета-лактамы антибиотики / С.В. Сидоренко, С.В. Яковлев // Русский медицинский журнал. – 1997. – № 5(21). – С. 1367-1381.
9. Смирнова, Г.В. Роль тиоловых редокс-систем при ответе бактерий *Escherichia coli* на стрессорные воздействия температур и антибиотиков / Г.В. Смирнова [и др.] // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 1. – С. 26-35.
10. Страчунский, Л.С. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов // М.: Боргес, 2002. – 436 с.
11. Тараховский, Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов, Е.Н. Музафаров // Пушино: Synchronobook, 2013. – 310 с.

12. Тимофеев, Н.П. Достижения и проблемы в области изучения, использования и прогнозирования биологической активности экдистероидов / Н.П. Тимофеев // Бутлеровские сообщения. – 2006. – Т. 8. – № 2. – С. 7-35.
13. Ткаченко, А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов / А.Г. Ткаченко // Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 268 с.
14. Фомина, И.П. Современные аминокликозиды: значение в инфекционной патологии, особенности действия / И.П. Фомина // Русский медицинский журнал. – 1997. – № 5(21). – С. 1382-1391.
15. Ширшова, Т.И. Антимикробная активность нативных экдистероидов растения *Serratula coronata* L. и некоторых их ацильных производных / Т.И. Ширшова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40. – № 5. – С. 34-36.
16. Щулькин, А.В. Современные представления о фармакодинамике экдистероидов / А.В. Щулькин [и др.] // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2012. – № 4. – С. 164-169.
17. Aggarwal, B.B. Resveratrol in health and disease / B.B. Aggarwal, S. Shishodia // CRC Press, 2005. – 713 p.
18. Ahmad, A. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA / A. Ahmad [et al.] // Toxicol. Lett. – 2005. – V. 159(1). – P. 1-12.
19. Ahmad, V.U. An antimicrobial ecdysone from *Asparagus dumosus* / V.U. Ahmad [et al.] // Fitoterapia. – 1996. – V. 67(1). – P. 88-91.
20. Aiassa, V. Sublethal ciprofloxacin treatment leads to resistance via antioxidant systems in *Proteus mirabilis* / V. Aiassa [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – V. 327(1). – P. 25-32.
21. Alam, M.N. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity / M.N. Alam, N.J. Bristi, M. Rafiquzzaman // Saudi Pharm. J. – 2013. – V. 21(2). – P. 143-152.

22. Albanese, C. Sustained mammary gland-directed, ponasterone A-inducible expression in transgenic mice / C. Albanese [et al.] // FASEB J. – 2000. – V. 14(7). – P. 877-884.
23. Albasa, I. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics / I. Albasa [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – V. 317(2). – P. 605-609.
24. Aldred, K.J. Mechanism of quinolone action and resistance / K.J. Aldred, R.J. Kerns, N. Osheroff // Biochemistry. – 2014. – V. 53(10). – P.1565-1574.
25. Altuvia, S. A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator / S. Altuvia [et al.] // Cell. – 1997. V. 90(1). – P. 43-53.
26. Anilakumar, K.R. Effect of cooking on total phenols, flavonoids and antioxidant activity in spices of Indian culinary / K.R. Anilakumar [et al.] // J. Food Sci. Technol. – 2007. – V. 44. – P. 357-359.
27. Anastasiadi, M. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts / M. Anastasiadi // J. Agric. Food. Chem. – 2009. – V. 57(2). – P. 457-463.
28. Apak, R. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) / R. Apak [et al.] // Pure Appl. Chem. – 2013. – V. 85(5). – P. 957-998.
29. Ariza, R.R. Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. / R.R. Ariza [et al.] // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177(7). – P. 1655-1661.
30. Aslund, F. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status / F. Aslund [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – V. 96(11). – P. 6161-6165.
31. Aura, A.M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon / A.M. Aura // Phytochem. Rev. – 2008. – V. 7. – P. 407-429.

32. Badarinath, A.V. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations / A.V. Badarinath [et al.] // Int. J. Pharm. Tech. Research. – 2010. – V. 2(2). – P. 1276-1285.
33. Bandara, B.M.R. Ecdysterone from stem of *Diploclisia glaucescens* / B.M.R. Bandara [et al.] // Phytochemistry. – 1989. – V. 28(4). – P. 1073-1075.
34. Bang, S.H. Metabolism of rutin and poncirin by human intestinal microbiota and cloning of their metabolizing α -L-rhamnosidase from *Bifidobacterium dentium* / S.H. Bang [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – V. 25(1). – P. 18-25.
35. Báthori, M. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids – structure and effects on humans / M. Báthori [et al.] // Curr. Med. Chem. – 2008. – V. 15(1). – P. 75-91.
36. Battesti, A. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli* / A. Battesti, N. Majdalani, S. Gottesman // Annu. Rev. Microbiol. – 2011. – V. 65. – P. 189-213.
37. Becerra, M.C. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* / M.C. Becerra, I. Albesa // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. – V. 297(4). – P. 1003-1007.
38. Becerra, M.C. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin / M.C. Becerra [et al.] // Mol. Cell Biochem. – 2006. – V. 285(1-2). – P. 29-34.
39. Becker, B. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century / B. Becker, M.A. Cooper // ACS Chem. Biol. – 2013. – V. 8(1). – P. 105 – 115.
40. Belenky, P. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage / P. Belenky [et al.] // Cell Rep. – 2015. – V. 13(5). – P. 968-980.
41. Belguendouz, L. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins / L. Belguendouz, L. Fremont, A. Linard // Biochem. Pharmacol. – 1997. – V. 53(9). – P. 1347-1355.

42. Berlett, B.S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B.S. Berlett, E.R. Stadtman // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272(33). – P. 20313-20316.
43. Bernal, P. Insertion of epicatechin gallate into the cytoplasmic membrane of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disrupts penicillin-binding protein (PBP) 2a-mediated β -lactam resistance by delocalizing PBP2 / P. Bernal [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – V. 285(31). – P. 24055-24065.
44. Breinholt, V. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat / V. Breinholt, S.T. Lauridsen, L.O. Dragsted // Xenobiotica. – 1999. – V. 29(12). – P. 1227-1240.
45. Britton, L. Intracellular localization of the superoxide dismutases of *Escherichia coli*: a reevaluation / L. Britton, I. Fridovich // J. Bacteriol. – 1977. – V. 131(3). – P. 815-820.
46. Bryan, L.E. Impermeability to quinolones in gram-positive and gram-negative bacteria / L.E. Bryan, J. Bedard // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1991. – V. 10(4). – P. 232-239.
47. Cabiscol, E. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species / E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros // Int. Microbiol. – 2000. – V. 3(1). – P. 3-8.
48. Cai, Y.J. Antioxidative and free radical scavenging effects of ecdysteroids from *Serratula strangulata* / Y.J. Cai [et al.] // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2002. – V. 80(12). – P. 1187-1194.
49. Canada, A.T. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols / A.T. Canada [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1990. – V. 9(5). – P. 441-449.
50. Cao, G. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships // G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior // Free. Radic. Biol. Med. – 1997. – V. 22(5). – P. 749-760.
51. Cardona, F. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health / F. Cardona [et al.] // J. Nutr. Biochem. – 2013. – V. 24(8). – P. 1415-1422.

52. Carlouz, A. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? / A. Carlouz, D. Touati // EMBO J. – 1986. – V. 5(3). – P. 623-630.
53. Carocho, M. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives / M. Carocho, I.C. Ferreira // Food Chem. Toxicol. – 2013. – V. 51. – P. 15-25.
54. Celep, G.S. Microbial metabolism of polyphenols and health / G.S. Celep, R. Rastmanesh, F. Marotta // Polyphenols in human health and disease. – Academic Press, 2013. – P. 577-589.
55. Chapman, J.S. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli* / J.S. Chapman, N.H. Georgopapadakou // Antimicrob. Agents Chemother. – 1988. – V. 32(4). – P. 438-442.
56. Chen, Y.H. Generation of reactive oxygen species mediates butein-induced apoptosis in neuroblastoma cells / Y.H. Chen [et al.] // Oncol. Rep. – 2012. – V. 27(4). – P. 1233-1237.
57. Chiang, S.M. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria / S.M. Chiang, H.E. Schellhorn // Arch. Biochem. Biophys. – 2012. – V. 525(2). – P. 161-169.
58. Chinnam, N. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner / N. Chinnam [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2010. – V. 46(5). – P. 478-486.
59. Christensen, L.P. The role of direct and indirect polyphenolic antioxidants in protection against oxidative stress / L.P. Christensen, K.B. Christensen // Polyphenols in human health and disease. – Academic Press, 2013. – P. 289-309.
60. Christman, M.F. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins / M.F. Christman, G. Storz, B.N. Ames // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – V. 86(10). – P. 3484-3488.

61. Chubiz, L.M. Transcriptional cross talk within the *mar-sox-rob* regulon in *Escherichia coli* is limited to the *rob* and *marRAB* operons / L.M. Chubiz, D.G. Glekas, C.V. Rao // J. Bacteriol. – 2012. – V. 194(18). – P. 4867-4875.
62. Clifford, M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health / M.N. Clifford // Planta Med. – 2004. – V. 70(12). – P. 1103-1114.
63. Collins, A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay / A.R. Collins // Mutat. Res. – 2009. – V. 681(1). – P. 24-32.
64. Constantino, S. The ecdysone inducible gene expression system: unexpected effects of muristerone A and ponasterone A on cytokine signaling in mammalian cells / S. Constantino [et al.] // Eur. Cytokine Netw. – 2001. – V. 12(2). – P. 365-367.
65. Crozier, A. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health / A. Crozier, I.B. Jaganath, M.N. Clifford // Nat. Prod. Rep. – 2009. – V. 26(8). – P. 1001-1043.
66. Cushnie, T.P. Antimicrobial activity of flavonoids / T.P. Cushnie, A.J. Lamb // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2005. – V. 26(5). – P. 343-356.
67. Cushnie, T.P. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids / T.P. Cushnie, A.J. Lamb // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2011. – V. 38(2). – P. 99-107.
68. D'Archivio, M. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies / M. D'Archivio [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2010. – V. 11(4). – P. 1321-1342.
69. Dadi, P.K. Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols / P.K. Dadi, M. Ahmad, Z. Ahmad // Int. J. Biol. Macromol. – 2009. – V. 45(1). – P. 72-79.
70. Dani, C. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae* / C. Dani [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2008. – V. 56(11). – P. 4268-4272.
71. Davies, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life / K.J. Davies // Biochem. Soc. Symp. – 1995. – V. 61. – P. 1-31.

72. Davies, K.J. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems / K.J. Davies // IUBMB Life. – 2000. – V. 50(4-5). – P. 279-289.
73. de Souza, R.F.V. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions // R.F.V. de Souza, W.F. De Giovani // Redox Rep. – 2004. – V. 9(2). – P. 97-104.
74. De Groote, M.A. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase / M.A. De Groote [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94(25). – P. 13997-4001.
75. Delcour, A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance / A.H. Delcour // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1794(5). – P. 808-816.
76. Demple, B. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology / B. Demple, L. Harrison // Annu. Rev. Biochem. – 1994. – V. 63. – P. 915-948.
77. Dinan, L. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals / L. Dinan, R. Lafont // J. Endocrinol. – 2006. – V. 191(1). – P. 1-8.
78. Dinan, L. Phytoecdysteroids: biological aspects / L. Dinan // Phytochemistry. – 2001. – V. 57(3). – P. 325-339.
79. Dinan, L. Phytoecdysteroids: diversity, biosynthesis and distribution / L. Dinan [et al.] // Ecdysone: structures and functions. – New York: Springer, 2009. – P. 3-45.
80. Dolar, P. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats / P. Dolar [et al.] // Mutat. Res. – 2005. – V. 591(1-2). – P. 237-246.
81. Dörr, T. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli* / T. Dörr, K. Lewis, M. Vulic // PLoS Genet. – 2009. – V. 5(12). – e1000760. – 9 p.
82. Dörr, T. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli* / T. Dörr, M. Vulic, K. Lewis // PLoS Biol. – 2010. – V. 8(2). – e1000317. – 8 p.

83. Drlica, K. Quinolone-mediated bacterial death / K. Drlica [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – V. 52(2). – P. 385-392.
84. Dueñas, M. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols / M. Dueñas [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2015. – V. 2015. – 15 p.
85. Dwyer, D.J. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli* / D.J. Dwyer [et al.] // Mol. Syst. Biol. – 2007. – V. 3(91). – 15 p.
86. Dwyer, D.J. Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality / D.J. Dwyer, J.J. Collins, G.C. Walker // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2015. – V. 55. – P. 313-332.
87. Dwyer, D.J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance / D.J. Dwyer, M.A. Kohanski, J.J. Collins // Curr. Opin. Microbiol. – 2009. – V. 12(5). – P. 482-489.
88. Dwyer, D.J. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality / D.J. Dwyer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – V. 111(20). – P. E2100-E2109.
89. Dwyer, D.J. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis / D.J. Dwyer [et al.] // Mol. Cell. – 2012. – V. 46(5). – P. 561-572.
90. Dzukharova, M.Kh. Pharmacokinetics of ecdysterone in experiments / M.Kh. Dzukharova [et al.] // Pharm. Chem. J. – 1987. – V. 21(10). – P. 689-692.
91. Eberhardt, M.V. Perspective. When dietary antioxidants perturb the thiol redox / M.V. Eberhardt, E.H. Jeffery // J. Sci. Food Agric. – 2006. – V. 86(13). – P. 1996-1998.
92. Eghbaliferiz, S. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals / S. Eghbaliferiz, M. Iranshahi // Phytother. Res. – 2016. – 13 p.
93. Eijkelkamp, B.A. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions / B.A. Eijkelkamp [et al.] // BMC Genomics. – 2011. – V. 12(126). – 14 p.

94. Eng, R.H. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria / R.H. Eng [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1991. – V. 35(9). – P. 1824-1828.
95. Espín J.C. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols / J.C. Espín, A. González-Sarrias, F.A. Tomás-Barberán // Biochem. Pharmacol. – 2017. – V. 139. – P. 82-93.
96. Erental, A. Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli* / A. Erental [et al.] // mBio. – 2014. – V. 5(4). – e01426. – 14 p.
97. Erk, T. Structure- and dose-absorption relationships of coffee polyphenols / T. Erk [et al.] // Biofactors. – 2014. – V. 40(1). – P. 103-112.
98. Eumkeb, G. Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime / G. Eumkeb, S. Sakdarat, S. Siri Wong // Phytomedicine. – 2010. – V. 18(1). – P. 40-45.
99. Ezraty, B. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway / B. Ezraty [et al.] // Science. – 2013. – V. 340(6140). – P. 1583-1587.
100. Fàbrega, A. Mechanism of action of and resistance to quinolones / A. Fàbrega [et al.] // Microb. Biotechnol. – 2009. – V. 2(1). – P. 40-61.
101. Farr, S.B. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* / S.B. Farr, T. Kogoma // Microbiol. Rev. – 1991. – V. 55(4). – P. 561-585.
102. Feng, C.Y. Effects of ecdysterone on the expression of NF-kappaB p65 in H₂O₂ induced oxidative damage of human lens epithelial cells / C.Y. Feng, X.R. Huang, M.X. Qi // Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. – 2012. – V. 32(1). – P. 76-79.
103. Fernández de Henestrosa, A.R. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli* / A.R. Fernández de Henestrosa [et al.] // Mol. Microbiol. – 2000. – V. 35(6). – P. 1560-1572.

104. Fiester, S.E. Stress responses in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii* / S.E. Fiester, L.A. Actis // Future Microbiol. – 2013. – V. 8(3). – P. 353-365.
105. Fraga, C.G. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology / C.G. Fraga [et al.] // John Wiley & Sons, 2009. – 593 p.
106. Fraga, C.G. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols / C.G. Fraga [et al.] // Mol. Aspects Med. – 2010. – V. 31(6). – P. 435-445.
107. Fridovich, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas / I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1989. – V. 264(14). – P. 7761-7764.
108. Friedberg, E.C. The SOS responses of prokaryotes to DNA damage / E.C. Friedberg [et al.] // DNA repair and mutagenesis. – 2nd ed. ASM Press, 2006. – P. 463-508.
109. Galati, G. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics / G. Galati [et al.] // Toxicology. – 2002. – V. 177(1). – P. 91-104.
110. Gardner, P.R. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase / P.R. Gardner, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266(29). – P. 19328-19333.
111. Gee, J.M. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway / J.M. Gee [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1998. – V. 25(1). – P. 19-25.
112. Ginsburg, I. Microbial and host cells acquire enhanced oxidant-scavenging abilities by binding polyphenols / I. Ginsburg, R. Kohen, E. Koren // Arch. Biochem. Biophys. – 2011. – V. 506(1). – P. 12-23.
113. Girault, J.P. Ecdysone catabolism in the white mouse / J.P. Girault, R. Lafont, U. Kerb // Drug Metab. Dispos. – 1988. – V. 16(5). – P. 716-720.
114. González-Flecha, B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli* / B. González-Flecha, B. Demple // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270(23). – P. 13681-13687.

115. Goswami, M. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* / M. Goswami, S.H. Mangoli, N. Jawali // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – V. 50(3). – P. 949-954.
116. Goswami, M. Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of *Escherichia coli* / M. Goswami, S.H. Mangoli, N. Jawali // Antimicrob. Agents Chemother. – 2007. – V. 51(3). – P. 1119-1122.
117. Goswami, M. Glutathione-mediated augmentation of beta-lactam antibacterial activity against *Escherichia coli* / M. Goswami, N. Jawali // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – V. 60(1). – P. 184-185.
118. Gradisar, H. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site / H. Gradisar [et al.] // J. Med. Chem. – 2007. – V. 50(2). – P. 264-271.
119. Greulich, P. Growth-dependent bacterial susceptibility to ribosome-targeting antibiotics / P. Greulich [et al.] // Mol. Syst. Biol. – 2015. – V. 11(3). – 0796. – 11 p.
120. Gülçin, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview / İ. Gülçin // Arch. Toxicol. – 2012. – V. 86(3). – P. 345-391.
121. Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? / B. Halliwell // Arch. Biochem. Biophys. – 2008. – V. 476(2). – P. 107-112.
122. Halliwell, B. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? / B. Halliwell, M. Whiteman // Br. J. Pharmacol. – 2004. – V. 142(2). – P. 231-255.
123. Halliwell, B. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems / B. Halliwell, O.I. Aruoma // FEBS Lett. – 1991. – V. 281(1-2). – P. 9-19.
124. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life / B. Halliwell // Plant Physiol. – 2006. – V. 141(2). – P. 312-322.
125. Han, X. Dietary polyphenols and their biological significance / X. Han, T. Shen, H. Lou // Int. J. Mol. Sci. – 2007. – V. 8(9). – P. 950-988.

126. Hancock, R.E. Antibiotic uptake into gram-negative bacteria / R.E. Hancock, A. Bell // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1988. – V. 7(6). – P. 713-720.
127. Haslam, E. Vegetable tannins – lessons of a phytochemical lifetime / E. Haslam // Phytochemistry. – 2007. – V. 68(22-24). – P. 2713-2721.
128. Hassan, H.M. Regulatory roles of Fnr, Fur, and Arc in expression of manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli* / H.M. Hassan, H.C. Sun // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89(8). – P. 3217-3221.
129. Hawkey, P.M. Mechanisms of quinolone action and microbial response / P.M. Hawkey // J. Antimicrob. Chemother. – 2003. – V. 51(1). – P. 29-35.
130. Hayakawa, F. Prooxidative activities of tea catechins in the presence of Cu²⁺ / F. Hayakawa [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2004. – V. 68(9). – P. 1825-1830.
131. Hengge, R. The general stress response in gram-negative bacteria / R. Hengge // Bacterial stress responses, Second edition. ASM Press. – 2011. – P. 251-289.
132. Hengge, R. Proteolysis of sigma S (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli* / R. Hengge // Res. Microbiol. – 2009. – V. 160(9). – P. 667-676.
133. Hengge, R. The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (sigma S) in *Escherichia coli* / R. Hengge // Adv. Exp. Med. Biol. – 2008. – V. 631. – P. 40-53.
134. Hengge-Aronis, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma (S) (RpoS) subunit of RNA polymerase / R. Hengge-Aronis // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2002. – V. 66(3). – P. 373-395.
135. Hidalgo, E. Activation of SoxR-dependent transcription *in vitro* by noncatalytic or NifS-mediated assembly of [2Fe-2S] clusters into apo-SoxR / E. Hidalgo, B. Dimple // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271(13). – P. 7269-7272.
136. Hiem, K.E. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships / K.E. Hiem, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya // J. Nutr. Biochem. – 2002. – V. 13(10). – P. 572-584.

137. Hikino, H. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice / H. Hikino, Y. Oizumi, T. Takemoto // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 1972. – V. 20(11). – P. 2454-2458.
138. Hirai, K. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* / K. Hirai [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1986. – V. 29(3). – P. 535-538.
139. Hoshino, N. Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin-copper (II) complexes / N. Hoshino [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – V. 27(11-12). – P. 1245-1250.
140. Hu, J. 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF- κ B and JNK pathways / J. Hu [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7(12). – e50764. – 17 p.
141. Hussein, R. Disruption of small RNA signaling caused by competition for Hfq / R. Hussein, H.N. Lim // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – V. 108(3). – P. 1110-1115.
142. Hwang, D. Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression / D. Hwang, Y.H. Lim // Sci. Rep. – 2015. – V. 5. – 10029. – 10 p.
143. Iga, M. Nongenomic action of an insect steroid hormone in steroid-induced programmed cell death / M. Iga, M. Iwami, S. Sakurai // Mol. Cell. Endocrinol. – 2007. – V. 263(1-2). – P. 18-28.
144. Ihssen, J. Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli* / J. Ihssen, T. Egli // Microbiology. – 2004. – V. 150(6). – P. 1637-1648.
145. Imlay, J.A. How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis / J.A. Imlay // Adv. Microb. Physiol. – 2002. – V. 46. – P. 111-153.
146. Imlay, J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide / J.A. Imlay // Annu. Rev. Biochem. – 2008. – V. 77. – P. 755-776.

147. Imlay, J.A. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro* / J.A. Imlay, S.M. Chin, S. Linn // Science. – 1988. – V. 240(4852). – P. 640-642.
148. Imlay, J.A. DNA damage and oxygen radical toxicity / J.A. Imlay, S. Linn // Science. – 1988. – V. 240(4857). – P. 1302-1309.
149. Imlay, J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium / J.A. Imlay // Nat. Rev. Microbiol. – 2013. – V. 11(7). – P. 443-454.
150. Imlay, J.A. Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species / J.A. Imlay // Annu. Rev. Microbiol. – 2015. – V. 69. – P. 93-108.
151. Imlay, J.A. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide / J.A. Imlay, S. Linn // J. Bacteriol. – 1987. – V. 169. – P. 2967-2976.
152. Ishihama, A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase / A. Ishihama // Annu. Rev. Microbiol. – 2000. – V. 54. – P. 499-518.
153. Ivanova, A. Role of *rpoS* (*katF*) in *oxyR*-independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli* / A. Ivanova [et al.] // Mol. Microbiol. – 1994. – V. 12(4). – P. 571-578.
154. James, C.E. How beta-lactam antibiotics enter bacteria: a dialogue with the porins / C.E. James [et al.] // PLoS One. – 2009. – V. 4(5). – e5453. – 9 p.
155. Janion, C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli* / C. Janion // Int. J. Biol. Sci. – 2008. – V. 4(6). – P. 338-344.
156. Kato, T. Induction of the SOS response and mutations by reactive oxygen-generating compounds in various *Escherichia coli* mutants defective in the *mutM*, *mutY* or *soxRS* loci / T. Kato, M. Watanabe, T. Ohta // Mutagenesis. – 1994. – V. 9(3). – P. 245-251.
157. Kaviarasan, K. Antioxidant efficacy of flavonoid-rich fraction from *Spermacoce hispida* in hyperlipidemic rats / K. Kaviarasan, P. Kalaiarasi, V. Pugalendi // J. Appl. Biomed. – 2008. – V. 6. – P. 165-176.

158. Kehrer, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity / J.P. Kehrer // Toxicology. – 2000. – V. 149(1). – P. 43-50.
159. Keren, I. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species // I. Keren [et al.] // Science. – 2013. – V. 339(6124). – P. 1213-1216.
160. Kholodova, Y. Phytoecdysteroids: biological effects, application in agriculture and complementary medicine / Y. Kholodova // Ukr. Biokhim. Zh. – 2001. – V. 73(3). – P. 21-29.
161. Kim, H.J. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents / H.J. Kim [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2005. – V. 53(20). – P. 7691-7695.
162. Kohanski, M.A. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics / M.A. Kohanski [et al.] // Cell. – 2007. – V. 130(5). – P. 797-810.
163. Kohanski, M.A. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks / M.A Kohanski, D.J Dwyer, J.J Collins // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – V. 8(6). – P. 423-435.
164. Kohanski, M.A. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger aminoglycoside-mediated oxidative stress and cell death / M.A. Kohanski [et al.] // Cell. – 2008. – V. 135(4). – P. 679-690.
165. Kolodkin-Gal, I. The communication factor EDF and the toxin-antitoxin module mazEF determine the mode of action of antibiotics / I. Kolodkin-Gal [et al.] // PLoS Biol. – 2008. – V. 6(12). – e319. – 12 p.
166. Korshunov, S. Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli* / S. Korshunov, J.A. Imlay // J. Bacteriol. – 2006. V. 188(17). – P. 6326-6334.
167. Kotra, L.P. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance / L.P. Kotra, J. Haddad, S. Mobashery // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – V. 44(12). – P. 3249-3256.

168. Kotsyuruba, A.V. Mechanisms of early effect of biologically active oxysterones calcitriol and ecdysterone, modulation of intracellular pools of arachidonic acid and products of its oxidative metabolism / A.V. Kotsyuruba [*et al.*] // Ukr. Biokh. Zh. – 1995. – V. 67(6). – P. 45-52.
169. Kowalczykowski, S.C. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli* / S.C. Kowalczykowski [*et al.*] // Microbiol. Rev. – 1994. – V. 58(3). – P. 401-465.
170. Kuzminov, A. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ / A. Kuzminov // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. – V. 63(4). – P. 751-813.
171. Lafont, R. Innovative and future applications for ecdysteroids / R. Lafont, L. Dinan // Ecdysone: structures and functions. – New York: Springer, 2009. – P. 551-578.
172. Lafont, R. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update / R. Lafont, L. Dinan // J. Insect. Sci. – 2003. – V. 3(7). – 30 p.
173. Lafont, R. Excretion and metabolism of injected ecdysone in the white mouse / R. Lafont, J.P. Girault, U. Kerb // Biochem. Pharmacol. – 1988. – V. 37(6). – P. 1174-1177.
174. Lambert, J.D. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention / J.D. Lambert, R.J. Elias // Arch. Biochem. Biophys. – 2010. – V. 501(1). – P. 65-72.
175. Lange, R. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability / R. Lange, R. Hengge-Aronis // Genes Dev. – 1994. – V. 8(13). – P. 1600-1612.
176. Lee, C. Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path / C. Lee [*et al.*] // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2004. – V. 11(12). – P. 1179-1185.

177. León-González, A.J. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy / A.J. León-González, C. Auger, V.B. Schini-Kerth // *Biochem. Pharmacol.* – 2015. – V. 98(3). – P. 371-380.
178. Leung, H.W. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis / H.W. Leung [*et al.*] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2006. – V. 534. – P. 12-18.
179. Lewin, C.S. The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim / C.S. Lewin, S.G. Amyes // *J. Med. Microbiol.* – 1991. – V. 34(6). – P. 329-332.
180. Little, J.W. The SOS Regulatory System / J.W. Little // *Regulation of gene expression in Escherichia coli.* – USA, 1996. – P. 453-479.
181. Little, J.W. The SOS regulatory system: control of its state by the level of RecA protease / J.W. Little // *J. Mol. Biol.* – 1983. – V. 167(4). – P. 791-808.
182. Liu, Y. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species / Y. Liu, J.A. Imlay // *Science.* – 2013. – V. 339(6124). – P. 1210-1213.
183. Lobritz, M.A. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration / M.A. Lobritz [*et al.*] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – V. 112(27). – P. 8173-8180.
184. Loewen, P.C. Purification and characterization of catalase HP11 from *Escherichia coli* K12 / P.C. Loewen, J. Switala // *Biochem. Cell Biol.* – 1986. – V. 64(7). P. 638-646.
185. Loewen, P.C. Molecular characterization of three mutations in *katG* affecting the activity of hydroperoxidase I of *Escherichia coli* / P.C. Loewen [*et al.*] // *Biochem. Cell Biol.* – 1990. V. 68(7-8). – P. 1037-1044.
186. Loft, S. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair / S. Loft [*et al.*] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – V. 36(5). – P. 1071-1076.
187. Long, L.H. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and

- quercetin to commonly used cell culture media / L.H. Long, M.V. Clement, B. Halliwell // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – V. 273(1). – P. 50-53.
188. López-Alarcón, C. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays / C. López-Alarcón, A. Denicola // *Anal. Chim. Acta.* – 2013. – V. 763. – P. 1-10.
189. Lovett, S.T. The DNA damage response / S.T. Lovett // *Bacterial stress responses* – 2nd.ed. ASM Press, 2011. – P. 205-228.
190. Lushchak, V.I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria / V.I. Lushchak // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2001. – V. 66(5). – P. 476-489.
191. Lushchak, V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals / V.I. Lushchak // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* – 2011. – V. 153(2). – P. 175-190.
192. MacDonald-Wicks, L.K. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review / L.K. MacDonald-Wicks, L.G. Wood, M.L. Garg // *J. Sci. Food Agric.* – 2006. – V. 86. – P. 2046-2056.
193. Magnet, S. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454 / S. Magnet, P. Courvalin, T. Lambert // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – V. 45(12). – P. 3375-3380.
194. Maisonneuve, E. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters / E. Maisonneuve, K. Gerdes // *Cell.* – 2014. – V. 157(3). – P. 539-548.
195. Maksimov, A.Y. Effect of flavonoids on the ecology of Enterobacteria / A.Y. Maksimov, N.B. Remezovskaya, V.A. Demakov // *Russian Journal of Ecology.* – 2003. – V. 34(2). – P. 110-113.
196. Malik, M. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones / M. Malik, X. Zhao, K. Drlica // *Mol. Microbiol.* – 2006. – V. 61(3). – P. 810-825.
197. Mamadalieva, N.Z. Phytoecdysteroids of *Silene guntensis* and their *in vitro* cytotoxic and antioxidant activity / N.Z. Mamadalieva [et al.] // *Z. Naturforsch. C.* – 2011. – V. 66(5-6). – P. 215-224.

198. Marathe, S.A. Curcumin reduces the antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* / S.A. Marathe [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2013. – V. 68(1). – P. 139-152.
199. Marín, L. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties / L. Marín [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2015. – 905215. – 18 p.
200. Martins, A. Ecdysteroids sensitize MDR and non-MDR cancer cell lines to doxorubicin, paclitaxel, and vincristine but tend to protect them from cisplatin / A. Martins [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2015. – V. 2015. – 895360. – 8 p.
201. Matias, E.F. Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A / E.F. Matias [et al.] // Chemotherapy. – 2011. – V. 57(4). – P. 305-309.
202. Matsuda, H. Pharmacological studies of insect metamorphosing steroids from *Achyranthis radix* / H. Matsuda, T. Kawaba, Y. Yamamoto // Folia Pharm. Jpn. – 1970. – V. 66. – P. 551-563.
203. Melidou, M. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation / M. Melidou, K. Riganakos, D. Galaris // Free Radic. Biol. Med. – 2005. – V. 39(12). – P. 1591-1600.
204. Mendes, F.R.S. Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. (Zingiberaceae): chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics / F.R.S. Mendes [et al.] // J. Essential Oil Res. – 2015. – V. 27(3). – P. 259-263.
205. Miller, C. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality / C. Miller [et al.] // Science. – 2004. – V. 305(5690). – P. 1629-1631.
206. Miller, J.H. Experiments in molecular genetics / J.H. Miller // Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. – 466 p.

207. Mingeot-Leclercq, M.P. Aminoglycosides: activity and resistance / M.P. Mingeot-Leclercq, Y Glupczynski, P.M. Tulkens // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – V. 43(4). – P. 727-737.
208. Mizusawa, S. Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of *sulA* protein / S. Mizusawa, S. Gottesman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1983. – V. 80(2). – P. 358-362.
209. Mocanu, M.M. Chemoprevention of breast cancer by dietary polyphenols / M.M. Mocanu, P. Nagy, J. Szöllősi // *Molecules.* – 2015. – V. 20(12). – P. 22578-22620.
210. Moco, S. Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods / S. Moco, F.P. Martin, S. Rezzi // *J. Proteome Res.* – 2012. – V. 11(10). – P. 4781-4790.
211. Moon, Y.J. Quercetin pharmacokinetics in humans / Y.J. Moon [et al.] // *Biopharm. Drug Dispos.* – 2008. – V. 29(4). – P. 205-217.
212. Mosel, M. Superoxide-mediated protection of *Escherichia coli* from antimicrobials / M. Mosel [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – V. 57(11). – P. 5755-5759.
213. Mulvey, M.R. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli* / M.R. Mulvey [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1990. – V. 172(12). – P. 6713-6720.
214. Mustard, J.A. Analysis of *Escherichia coli* RecA interactions with LexA, λ CI, and UmuD by site-directed mutagenesis of *recA* / J.A. Mustard, J.W. Little // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182(6). – P. 1659-1670.
215. Mykhaylyk, O.M. Signal transduction of erythrocytes after specific binding of ecdysterone and cholesterol immobilized on nanodispersed magnetite / O.M. Mykhaylyk [et al.] // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* – 2001. – V. 225(1-2). – P. 226-234.
216. Nagata, H. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase / H. Nagata [et al.] // *Tokai J. Exp. Clin. Med.* – 1999. – V. 24(1). – P. 1-11.

217. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited / H. Nikaido // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2003. – V. 67(4). – P. 593-656.
218. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability / H. Nikaido, M. Vaara // Microbiol. Rev. – 1985. – V. 49(1). – P. 1-32.
219. Nsimba, R.Y. Ecdysteroids act as inhibitors of calf skin collagenase and oxidative stress / R.Y Nsimba, H. Kikuzaki, Y. Konishi // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2008. – V. 22(4). – P. 240-250.
220. Nyamoita, M.G. Toxicity of individual and blends of pure phytoecdysteroids isolated from *Vitex schiliebenii* and *Vitex payos* against *Anopheles gambiae* s.s. larvae / M.G. Nyamoita // World J. Org. Chem. – 2013. – V. 1(1). – P. 1-5.
221. Oehme, I. Agonists of an ecdysone-inducible mammalian expression system inhibit Fas Ligand- and TRAIL-induced apoptosis in the human colon carcinoma cell line RKO / I. Oehme, S. Bösser, M. Zörnig // Cell Death Differ. – 2006. – V. 13(2). – P. 189-201.
222. Ogawa, S. Pharmacology of ecdysones in Vertebrates // S. Ogawa, N. Nishimoto, H. Matsuda // Invertebrate endocrinology and hormonal heterophyly. – Springer Berlin Heidelberg, 1974. – P. 341-344.
223. Ohshima, H. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion / H. Ohshima [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1998. – V. 25(9). – P. 1057-1065.
224. Oktyabrsky, O. Assessment of anti-oxidant activity of plant extracts using microbial test systems / O. Oktyabrsky [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2009. – V. 106(4). – P. 1175-1183.
225. Oliveira, C.M. Oxidation mechanisms occurring in wines / C.M. Oliveira [et al.] // Food Research International. – 2011. – V. 44(5). – P. 1115–1126.
226. Oteiza, P.I. Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? / P.I. Oteiza [et al.] // Clin. Dev. Immunol. – 2005. – V. 12(1). – P. 19-25.

227. Páez, P.L. Effect of the association of reduced glutathione and ciprofloxacin on the antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus* / P.L. Páez, M.C. Becerra, I. Albesa // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – V. 303(1). – P. 101-105.
228. Pagès, J.M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria / J.M. Pagès, C.E. James, M. Winterhalter // Nat. Rev. Microbiol. – 2008. – V. 6(12). – P. 893-903.
229. Parisi, O.I. Polyphenols and their formulations: different strategies to overcome the drawbacks associated with their poor stability and bioavailability / O.I. Parisi [et al.] // Polyphenols in human health and disease. – Academic Press, 2013. – P. 29-45.
230. Perron, N.R. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding / N.R. Perron, J.L. Brumaghim // Cell Biochem. Biophys. – 2009. – V. 53(2). – P. 75-100.
231. Phenol-Explorer. Database on polyphenol content in food. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://phenol-explorer.eu/contents/food/135>, <http://phenol-explorer.eu/contents/food/141>.
232. Phillips, I. In vitro properties of the quinolones / I. Phillips, A. King, K. Shannon // The quinolones. – Academic Press, 1988. – P. 83-118.
233. Piddock, L.J. The effect of altered porin expression in *Escherichia coli* upon susceptibility to 4-quinolones / L.J. Piddock, R.J. Wise // Antimicrob. Chemother. – 1986. – V. 18(4). – P. 547-549.
234. Plaper, A. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase / A. Plaper [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – V. 306(2). – P. 530-536.
235. Pomposiello, P.J. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors / P.J. Pomposiello, B. Dimple // Trends Biotechnol. – 2001. V. 19(3). – P. 109-114.
236. Poole, K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria / K. Poole // Trends in Microbiology. – 2012. – V. 20(5). – P. 227-234.

237. Poole, K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in gram-negative bacteria / K. Poole // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2002. – V. 3(2). – P. 77-98.
238. Potrykus, K. ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli* / K. Potrykus [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 13(3). – P. 563-575.
239. Pratt, L.A. Crl stimulates RpoS activity during stationary phase / L.A. Pratt, T.J. Silhavy // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 29(5). – P. 1225-1236.
240. Prior, R.L. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements / R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – V. 53(10). – P. 4290-4302.
241. Procházková, D. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids / D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová // *Fitoterapia.* – 2011. – V. 82(4). – P. 513-523.
242. Pryor, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions / W.A. Pryor // *Ann. Rev. Physiol.* – 1986. – V. 48. – P. 657-667.
243. Rockenbach, I.I. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes widely produced in Brazil / I.I. Rockenbach [et al.] // *Food Chemistry.* – 2011. – V. 127(1). – P. 174-179.
244. Rosenberg, E.Y. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein / E.Y. Rosenberg [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2003. – V. 48(6). – P. 1609-1619.
245. Rosner, J.L. Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyrityl in *Escherichia coli* / J.L. Rosner [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2002. – V. 184(5). – P. 1407-1416.
246. Redgrave, L.S. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success / L.S. Redgrave [et al.] // *Trends Microbiol.* – 2014. – V. 22(8). – P. 438-445.

247. Renggli, S. Role of autofluorescence in flow cytometric analysis of *Escherichia coli* treated with bactericidal antibiotics / S. Renggli [et al.] // J. Bacteriol. – 2013. – V. 195(18). – P. 4067-4073.
248. Ron, E.Z. Bacterial stress response / E.Z. Ron // The Prokaryotes. Springer Berlin Heidelberg. – 2013. – P. 589-603.
249. Samoilova, Z. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics / Z. Samoilova [et al.] // Microbiol. Res. – 2014. – V. 169(4). – P. 307-313.
250. Schellhorn, H.E. Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli* / H.E. Schellhorn // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. V. 131(2). – P. 113-119.
251. Schnarr, M. DNA binding properties of the LexA repressor / M. Schnarr [et al.] // Biochimie. – 1991. – V. 73(4). – P. 423-431.
252. Seaver, L.C. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? / L.C. Seaver, J.A. Imlay // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279(47). – P. 48742-48750.
253. Seaver, L.C. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli* / L.C. Seaver, J.A. Imlay // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183(24). – P. 7173-7181.
254. Sekiya, M. Binding of phytopolyphenol piceatannol disrupts β/γ subunit interactions and rate-limiting step of steady-state rotational catalysis in *Escherichia coli* F1-ATPase / M. Sekiya [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287(27). – P. 22771-22780.
255. Šelepová, L. Influence of *Rhaponticum carthamoides* Wild on the growth of ruminal bacteria *in vitro* and on fermentation in an artificial rumen (Rusitec) / L. Šelepová [et al.] // Arch. Anim. Nutr. – 1993. – V. 43(2). – P. 147-156.
256. Shyur, L.-F. Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan / L.-F. Shyur [et al.] // Inter. J. Appl. Sci. Eng. Technol. – 2005. – V. 3(3). – P. 195-202.

257. Si, X. Protective effects of mangosteen extract on H₂O₂-induced cytotoxicity in SK-N-SH cells and scopolamine-induced memory impairment in mice / X. Si [*et al.*] // J. Chin. Pharm. Sci. – 2014. – V. 23(1). – P. 33-38.
258. Sies, H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection / H. Sies // Mutat. Res. – 1993. – V. 299(3-4). – P. 183-91.
259. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants / H. Sies // Exp. Physiol. – 1997. – V. 82(2). – P. 291-295.
260. Sigler, K. Oxidative stress in microorganisms-I. Microbial vs. higher cells-damage and defenses in relation to cell aging and death / K. Sigler [*et al.*] // Folia Microbiol. (Praha). – 1999. – V. – 44(6). – P. 587-624.
261. Silva, M.M. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination / M.M. Silva [*et al.*] // Free Radic. Res. – 2002. – V. 36. – P. 1219-1227.
262. Simmons, L.A. The SOS regulatory network / L.A. Simmons [*et al.*] // EcoSal Plus. – 2008. – V. 2008. – 48 p.
263. Simon, P. Ecdysteroids in vertebrates: pharmacological aspects / P. Simon, J. Koolman // Ecdysone: from chemistry to mode of action. – Thieme Verlag, 1989. – P. 254-259.
264. Smirnova, G.V. Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress / G.V. Smirnova [*et al.*] // Free Radic. Biol. Med. – 2009. – V. 46(6). – P. 759-768.
265. Smirnova, G.V. Evaluation of antioxidant properties of medical plants using microbial test systems / G. V. Smirnova [*et al.*] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 26. – P. 2269-2276.
266. Smirnova, G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent systems in the *Escherichia coli* responses to ciprofloxacin and ampicillin / G. Smirnova [*et al.*] // Arch. Microbiology. – 2016. – V. 198(9). – P. 913-921.
267. Smirnova, G. Influence of plant polyphenols and medicinal plant extracts on antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* / G. Smirnova [*et al.*] // J. Appl. Microbiol. – 2012. – V. 113(1). – P. 192-199.

268. Smirnova, G.V. Ciprofloxacin provokes SOS-dependent changes in respiration and membrane potential and causes alterations in the redox status of *Escherichia coli* / G.V. Smirnova [et al.] // Res. in Microbiology. – 2017. – V. 168(1). – P. 64-73.
269. Smith, A.H. Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract / A.H. Smith, R.I. Mackie // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70(2). – P. 1104-1115.
270. Smith, A.H. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins / A.H. Smith, J.A. Imlay, R.I. Mackie // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69(6). – P. 3406-3411.
271. Smith, J.T. Chemistry and mechanisms of action of the quinolone antibacterials / J.T. Smith, C.S. Lewin // The quinolones. – Academic Press, 1988. – P. 23-82.
272. Sousa, E.O. *Lantana montevidensis* Briq improves the aminoglycoside activity against multiresistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / E.O. Sousa [et al.] // Indian J. Pharmacol. – 2011. – V. 43(2). – P. 180-182.
273. Stapleton, P.D. The β -lactam-resistance modifier (-)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus* / P.D. Stapleton [et al.] // Microbiology. – 2007. – V. 153(Pt 7). – P. 2093-2103.
274. Stark, G. Functional consequences of oxidative membrane damage / G. Stark // J. Membr. Biol. – 2005. – V. 205(1). – P. 1-16.
275. Steinman, H.M. The manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli* K-12 associates with DNA / H.M. Steinman, L. Weinstein, M. Brenowitz // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269(46). – P. 28629-28634.
276. Storz, G. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation / G. Storz, L.A. Tartaglia, B.N. Ames // Science. – 1990. – V. 248(4952). – P. 189-194.
277. Subramanian, M. DNA damage is a late event in resveratrol-mediated inhibition of *Escherichia coli* / M. Subramanian, S. Soundar, S. Mangoli // Free Radic. Res. – 2016. – V. 50(7). – P. 708-719.

278. Subramanian, M. Resveratrol induced inhibition of *Escherichia coli* proceeds via membrane oxidation and independent of diffusible ROS generation / M. Subramanian [et al.] // Redox Biol. – 2014. – V. 2. – P. 865-872.
279. Tang, S.Y. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? / S.Y. Tang, B. Halliwell // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – V. 394(1). – P. 1-5.
280. Tao, K. Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: Homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins / K. Tao [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1989. – V. 218(3). – P. 371-376.
281. Tattevin, P. Subinhibitory fluoroquinolone exposure selects for reduced beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and alterations in the SOS-mediated response / P. Tattevin, L. Basuino, H.F. Chambers // Res. Microbiol. – 2009. – V. 160(3). – P. 187-192.
282. Terao, J. Dietary flavonoids as antioxidants / J. Terao // Forum Nutr. – 2009. – V. 61. – P. 87-94.
283. Touati, D. Superoxide dismutases in bacteria and pathogen protists / D. Touati // Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. – P. 447-493.
284. Touati, D. Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli* – how many ways are there to trigger *soxRS* response? / D. Touati // Redox Rep. – 2000. – V. 5(5). – P. 287-293.
285. Traxler, M.F. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli* / M.F. Traxler [et al.] // Mol. Microbiol. – 2008. – V. 68(5). – P. 1128-1148.
286. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols / R. Tsao // Nutrients. – 2010. – V. 2(12). – P. 1231-1246.

287. Tsitsimpikou, C. Study of excretion of ecdysterone in human urine / C. Tsitsimpikou [et al.] // Rapid Commun. Mass. Spectrom. – 2001. – V. 15(19). P. 1796-1801.
288. Tuomanen, E. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth / E. Tuomanen [et al.] // J. Gen. Microbiol. – 1986. – V. 132(5). – P. 1297-1304.
289. Tzounis, X. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora / X. Tzounis [et al.] // Br. J. Nutr. – 2008. – V. 99(4). – P. 782-792.
290. van Acker, S.A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids / S.A. van Acker [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1996. – V. 20(3). – P. 331-342.
291. van Duynhoven, J. Interactions of black tea polyphenols with human gut microbiota: implications for gut and cardiovascular health / J. van Duynhoven [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2013. – V. 98. – P. 1631-1641.
292. van Duynhoven, J. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism / J. van Duynhoven [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – V. 108(1). – P. 4531-4538.
293. Van Leeuw, R. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: specificity of Pinot Noir / R. Van Leeuw [et al.] // J. Food Comp. Analysis. – 2014. – V. 36(1-2). – P. 40-50.
294. Volkert, M.R. Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents / M.R. Volkert [et al.] // Mutat. Res. – 1989. – V. 217(2). – P. 109-115.
295. Wang, Q. Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus* / Q. Wang, H. Wang, M. Xie // Arch. Microbiol. – 2010. – V. 192(11). – P. 893-898.
296. Wang, X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality / X. Wang, X. Zhao // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – V. 53(4). – P. 1395-1402.
297. Wang, Y.S. New cytotoxic steroid from *Stachyurus himalaicus* var. *himalaicus* / Y.S. Wang [et al.] // Molecules. – 2007. – V. 12(3). – P. 536-542.

298. Wassarman, K.M. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity / K.M. Wassarman, G. Storz // *Cell*. – 2000. – V. 101(6). – P. 613-623.
299. Waterhouse, A.L. Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses / A.L. Waterhouse, V.F. Laurie // *Am. J. Enol. Vitic.* – 2006. – V. 57(3). – P. 306-313.
300. Watson, R.R. Polyphenols in human health and disease / R.R. Watson, V.R. Preedy, S. Zibadi // Academic Press, 2013. – 1419 p.
301. Weber, H. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigma S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity / H. Weber [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187(5). – P. 1591-1603.
302. Wickens, H.J. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure / H.J. Wickens [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – V. 44. – P. 682-687.
303. Wilson, B.A. Antimicrobial compounds / B.A. Wilson [et al.] // *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. – 3rd ed. ASM Press, 2011. – P. 317-346.
304. Wilson, D.N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance / D.N. Wilson // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2014. – V. 12(1). – P. 35-48.
305. Witkin, E.A. The radiation sensitivity of *Escherichia coli* B: a hypothesis relating filament formation and prophage induction / E.A. Witkin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1967. – V. 57(5). – P. 1275-1279.
306. Wolfe, K.L. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements / K.L. Wolfe, R.H. Liu // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – V. 55(22). – P. 8896-8907.
307. Wood, L.G. A review of the methodology for assessing *in vivo* antioxidant capacity / L.G. Wood, P.G. Gibson, M.L. Garg // *J. Sci. Food Agric.* – 2006. – V. 86. – P. 2057-2066.
308. Wu, D. D-Alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin / D. Wu [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2008. – V. 32(5). – P. 421-426.

309. Wu, J. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli* / J. Wu, B. Weiss // B. J. Bacteriol. – 1991. – V. 173(9). – P. 2864-2871.
310. Wu, L.C. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya / L.C. Wu [et al.] // Food Chem. – 2006. – V. 95(2). – P. 319-327.
311. Yamashita, N. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu (II) / N. Yamashita, H. Tanemura, S. Kawanishi // Mutat. Res. – 1999. – V. 425(1). – P. 107-115.
312. Yen, G.C. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes / G.C. Yen [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2003. – V. 67(6). – P. 1215-1222.
313. Yoshida, Y. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity *in vivo* / Y. Yoshida, A. Umeno, M. Shichiri / J. Clin. Biochem. Nutr. – 2013. – V. 52(1). P. 9-16.
314. Zeng, X. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria / X. Zeng, J. Lin // Front. Microbiol. – 2013. – V. 4(128). – 9 p.
315. Zhang, A. The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein / A. Zhang [et al.] // EMBO J. – 1998. – V. 17(20). – P. 6061-6068.
316. Zhao, X. Quinolones / X. Zhao [et al.] // Encyclopedia of Microbiology. – 3rd ed, 2009. – P. 707-716.
317. Zheng, M. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation // M. Zheng, F. Aslund, G. Storz // Science. – 1998. – V. 279(5357). – P. 1718-1721.
318. Zimmermann, W. Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics / W. Zimmermann, A. Rosselet // Antimicrob. Agents Chemother. – 1977. – V. 12(3). – P. 368-372.