

ТРИАНДАФИЛОВА ГАЛИНА АНДРЕЕВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ОКСОПРОИЗВОДНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2025

Работа выполнена в лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»), Пермь.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией физиологии и
генетики микроорганизмов
«ИЭГМ УрО РАН»

Октябрьский Олег Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
кафедры промышленной технологии лекарств
с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО
«Пермской государственной
фармацевтической академии»
Минздрава России

Несчисляев Валерий Александрович

кандидат медицинских наук, доцент кафедры
микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО
«Пермский государственный медицинский
университет имени академика Е.А. Вагнера»
Минздрава России

Годовалов Анатолий Петрович

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Самарский государственный
медицинский университет» Минздрава России
(443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89)

Защита состоится « » ноября 2025 г. в « : » на заседании Диссертационного совета 24.1.201.03 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: +7 (324) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ПФИЦ УрО РАН (г. Пермь, ул. Академика Королева, д. 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат диссертации разослан « » 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Несмотря на большое разнообразие лекарственных веществ, присутствующих на мировом рынке, поиск новых препаратов остается актуальной задачей. В первую очередь это связано с поиском более безопасных для организма человека веществ, обладающих пониженным общетоксическим действием и отсутствием побочных эффектов. Другой важной проблемой является зависимость эффективности препаратов от индивидуальных особенностей организма человека. Это особенно справедливо в случае с микробиомным составом желудочно-кишечного тракта (The Human Microbiome Project Consortium et al., 2012). Микробиом ЖКТ человека содержит около 10^8 микроорганизмов, большая часть которых является бактериями (Gholizadeh et al., 2019). Они играют важную роль в пищеварении, секретируют полезные метаболиты, в том числе витаминов К и группы В, участвуют в формировании иммунитета. Изменения в составе микробиома коррелируют с заболеваниями желудочно-кишечного тракта и нервной системы (Kho, Lal, 2018; Rowland et al., 2018). При пероральном применении лекарственного вещества происходит его взаимодействие с представителями кишечной микрофлоры, которое может привести к изменению микробиомного состава. Известно, что не только антибиотические препараты, но и представители групп антипсихотиков и ингибиторов протонной помпы способны проявлять видоспецифические бактериостатические свойства (Maier et al., 2018; Vich Vila et al., 2020). С другой стороны, бактерии способны к биотрансформации лекарственных препаратов, изменяя их биологическую активность. Возможно усиление токсичности препарата, либо, наоборот, трансформация пролекарства в активную молекулу (Enright et al., 2016). В связи со сложностью культивирования *in vitro* отдельных представителей микробиома первым шагом в прогнозировании взаимодействия молекула – микробиом может стать скрининговое исследование веществ с применением микробных тест-систем на основе таких хорошо изученных бактерий, как *Escherichia coli*.

Представители оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов (ОАГ), содержащие енаминоновый фрагмент ($\text{N}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$), рассматриваются как универсальные блоки для создания новых биологически активных молекул благодаря сочетанию нуклеофильных и электрофильных свойств сопряженной системы ($\text{N}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$). Среди представителей этой группы были обнаружены вещества, обладающие противомикробной, анальгетической, противовоспалительной, противосудорожной, противораковой активностью (Boteva et al., 2019; J. Gao et al., 2023; Jiang et al., 2020). Биологическую активность ряда ОАГ связывают с антиоксидантным действием (Callaway et al., 2001).

Цель исследования.

Изучить изменение физиологических параметров роста лабораторных штаммов бактерий *Escherichia coli* и состава микробиома кишечника лабораторных крыс под действием ряда оксопроизводных азотсодержащих гетероциклических веществ.

Основные задачи исследования:

1. Провести первичный скрининг 26 ОАГ на наличие радикалсвязывающей и антимикробной активности, используя химические тесты и культуры бактерий *E. coli*;
2. Изучить ростовые свойства тест-штамма *E. coli* и его способность к образованию биопленок под влиянием оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов с различным сочетанием антиоксидантной и антимикробной активности;
3. Изучить про- и антиоксидантную активность ОАГ, используя бесклеточную систему и бактерии *E. coli*;
4. Используя нокаут-мутанты *E. coli*, изучить изменения в компонентах энергодающей системы бактерий под действием ОАГ с антибактериальными свойствами;
5. Изучить изменения в составе микробиома кишечника крыс под действием отдельных соединений.

Научная новизна работы.

Впервые выявлен ряд ОАГ, обладающих бактериостатическим действием по отношению к *E. coli*. Ни одно из изученных соединений не обладает бактерицидными свойствами.

Впервые показано, что четыре ОАГ способны снижать биопленкообразование у бактерий *E. coli*.

Используя непрерывную регистрацию уровня кислорода непосредственно в инкубационной среде, впервые показано, что действие CBR-384 полностью, а CBR-386 частично сопровождается ингибированием дыхания, степень которого соответствует влиянию этих соединений на рост бактерий.

Впервые показано, что ингибирование роста *E. coli* сопровождается увеличением уровня внеклеточного глутатиона (GSH) при действии CBR-384 и CBR-386 и утечкой сульфида при действии CBR-384. Оба соединения способны снижать мембранный потенциал.

Используя мутантные штаммы с делециями по элементам дыхательной цепи (убихинону, менахинону и четырем субъединицам АТФазы) впервые изучено действие CBR-384 и CBR-386 на энергодающие системы бактерий *E. coli*. Установлено, что накопление биомассы всеми мутантными штаммами, кроме *menA*, при действии данных веществ подавляется меньше, чем в родительском штамме.

Впервые показано существенное влияние CBR-384 на микробиомный состав кишечника крыс: наблюдалось увеличение количества бактерий вида *Akkermansia muciniphila* и снижение количества представителей родов *Shigella* и *Stenotrophomonas*. Установлено отсутствие значимого воздействия на состав микробиома кишечника крыс соединения CBR-124.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Исследуемые вещества являются потенциальными лекарственными препаратами. При пероральном приеме компоненты лекарств, в первую очередь, встречаются с микробиомом ЖКТ. В этой связи, особое значение имеет возможное влияние препаратов на такие подробно изученные нами свойства *Escherichia coli*, как скорость роста, колониеобразующая способность и способность к биопленкообразованию. Важными факторами успешной конкурентной борьбы нормальной микробиоты с патогенами являются как более высокая скорость размножения, так и способность к образованию биопленок, препятствующих колонизации ЖКТ другими микроорганизмами, включая патогены. Полученные нами данные позволяют учесть потенциальное влияние конкретного вещества на микробиом кишечника при разработке на его основе лекарственного препарата. Кроме того, данные о соответствии структур веществ и их влиянии на бактерии *E. coli* позволяют синтезировать вещества с набором заданных свойств: например, эффективные бактериостатики с анальгетическим действием и низкой токсичностью.

Для характеристики антимикробных свойств лекарственных препаратов, не планируемых к применению в качестве антибиотиков, обычно указывается значение МИК. Все чаще обсуждается вопрос о крайней недостаточности этого показателя для оценки терапевтической эффективности таких препаратов и необходимости более детального изучения их действия на микробиом, как положительного, так и отрицательного. Так, благодаря сочетанию методов определения МИК, влияния на скорость роста бактерий и влияния на КОЕ было установлено, что ряд веществ обладает бактериостатическим, но не бактерицидным действием. Кроме того, увеличение степени аэрации культуры значительно изменяло характер воздействия двух веществ. Эти данные позволяют более эффективно выбрать потенциальную область применения.

Определение влияния веществ на биопленкообразование бактерий также имеет серьезное значение. Так, CBR-124, не обладающее антибактериальными свойствами, способно значительно снижать количество образующейся биопленки, при этом его ближайший аналог CBR-125 не влияет на биопленкообразование. Эти данные позволяют в дальнейшем определить механизм влияния заместителей в молекуле на данный процесс.

Полученные данные об увеличении уровня внеклеточного глутатиона и утечки сульфида бактерий, сопровождающиеся ингибированием роста тест-штамма *E. coli*, вносят вклад в

расшифровку механизма антимикробного действия одного из классов оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов. Полученные данные могут быть использованы для первичного скрининга веществ с антимикробной активностью.

В настоящее время наблюдается настоящий бум работ по исследованию количественных и качественных характеристик микробиома человека и животных. Актуально изучение влияния различных факторов в норме и патологии на эти характеристики. Необходим поиск оптимального набора методов и подходов для изучения действия перспективных химических соединений как на микробиом, так и наиболее активных его представителей. Наша работа вносит вклад в решение этой проблемы.

Результаты исследования соединений CBR-384, CBR-124 и CBR-376 и их влияния на микробиом кишечника лабораторных животных позволяют рассматривать данные вещества в качестве модуляторов состава кишечной микрофлоры. Наши данные могут быть использованы для определения корреляции между структурами веществ и их свойствами и дальнейшего предсказания возможных взаимодействий с бактериями, близкими по метаболическим путям к *Escherichia coli*.

Методология и методы исследования.

Для достижения поставленной цели и решения задач исследования были использованы современные микробиологические и биохимические методы, а также методы молекулярной биологии и геномной инженерии. Исследования, проводимые на лабораторных животных, соответствовали правилам гуманного обращения и одобрены Этическим комитетом ИЭГМ Уро РАН (протокол № 20 от 21.03.2023).

Положения, выносимые на защиту.

1. Снижение скорости роста и биопленкообразования *E. coli* под влиянием оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов не сопровождается гибелью бактерий (бактерицидное действие) и воздействием на генетический аппарат клетки (генотоксическое действие).
2. Не обнаружено про- и антиоксидантного действия ОАГ в тестах с бактериями при наличии у ряда веществ радикалсвязывающей активности в химических тестах.
3. Снижение дыхательной активности, мембранного потенциала, увеличение экстраклеточного глутатиона и сульфида *E. coli* приводит к ингибированию роста бактерий под влиянием CBR-384 и CBR-386.
4. Три ОАГ различным образом влияют на микробиомный состав кишечника лабораторных крыс.

Апробация результатов.

Результаты работы были представлены на 24-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА», Пущино, 2020; Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», Москва, 2021; 3м Российском микробиологическом конгрессе, Псков, 2021; VII Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Пущино, 2021; 25-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА», Пущино, 2022; 26-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА», Пущино, 2023.

Апробация работы состоялась 20 сентября 2023 г. на заседании Проблемной комиссии Института экологии и генетики микроорганизмов, филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (Протокол № 4 от "20" сентября 2023 г.)

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен анализ литературных данных, выполнена основная часть экспериментальной работы и статистическая обработка данных. Совместно с научным руководителем Октябрьским О. Н. и д.б.н., в.н.с. Г. В. Смирновой сформулированы цель и задачи исследования, проведен анализ полученных данных. Исследуемые химические соединения были синтезированы в Научно-образовательном центре прикладных химических и биологических исследований (НОЦ ХимБИ) ПНИПУ. Секвенирование образцов кала крыс и биоинформатическую обработку полученных данных проводили в ЦКП «Геном» института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в журнале, индексируемом в базе цитирования Scopus.

Связь работы с научными программами.

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. Исследования выполнены при финансовой поддержке Государственного задания по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» (номер госрегистрации АААА-А19-119112290009-1) и гранта РФФИ № 20-34-90016 «Исследование биологической активности оксопроизводных азотсодержащих гетероциклических соединений».

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 150 страницах печатного текста, включая 32 рисунка, 2 таблицы и 3 приложения; состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, пяти глав собственных исследований, заключения и выводов. Список литературы содержит 232 источника.

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность д.б.н., профессору Октябрьскому О. Н. за руководство научной работой, д.б.н., в.н.с. Смирновой Г. В. и всем сотрудникам лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН за помощь в планировании и проведении исследований. Также автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам НОЦ ХимБИ ПНИПУ к.х.н. Красных О. П и к.х.н. Ботевой А. А. за предоставление образцов химических веществ и к.м.н. Солодникову С. Ю. за помощь в проведении экспериментов на лабораторных животных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – бактерии *Escherichia coli*, 26 химических соединений известной структуры, лабораторные крысы линии Sprague Dawley. Исследуемые химические соединения относятся к оксопроизводным азотсодержащих гетероциклов и их структурным аналогам. Все соединения были разделены на 4 группы, имеющие в своей структуре общий фрагмент и отличающиеся друг от друга заместителями.

Бактериальные штаммы. В работе использовались бактериальные штаммы, представленные в Таблице 1.

Штаммы *E. coli*, использованные в исследовании

Штамм	Генотип	Источник
BW25113 (wt)	F-, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(<i>::rrnB-3</i>), Δ -, <i>rph-I</i> , $\Delta\Delta$ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	the Keio collection
NM3012	<i>sulA(slfA)::lacZ</i>	Музей ЛФГМ
NM3021	<i>katG::lacZ</i>	Музей ЛФГМ
JW3901	Δ <i>menA</i>	the Keio collection
JW5713	Δ <i>ubiC</i>	the Keio collection
JW3712	Δ <i>atpA</i>	the Keio collection
JW3709	Δ <i>atpC</i>	the Keio collection
JW3715	Δ <i>atpE</i>	the Keio collection
JW3716	Δ <i>atpB</i>	the Keio collection
JW2669	Δ <i>recA</i>	the Keio collection

Штамм NM3012 был сконструирован путем введения слияния *sulA (sfiA)::lacZ* из *E. coli* DM4000 (получен от M. Volkert) в штамм BW25113 посредством трансдукции фагом PI. Штамм NM3021 (*katG::lacZ*) был создан путем трансформации BW25113 плазмидой pKT1033.

Среды и условия культивирования. Бактерии *E. coli* выращивали аэробно на минимальной среде M9 (Na_2HPO_4 * 12 H_2O – 15.13 г/л; KH_2PO_4 - 3 г/л; NH_4Cl – 1 г/л; NaCl – 0.5 г/л; MgSO_4 * 7 H_2O – 0.246 г/л; CaCl_2 – 0.011 г/л) с добавлением 0.15% глюкозы.

За ростом бактерий следили по изменению оптической плотности суспензии клеток при длине волны 600 нм (OD_{600}), измеряемой на фотоэлектроколориметре КФК-2 (толщина кюветы 5 мм) при выращивании в колбах и на спектрофотометре Bio-Rad xMark при выращивании в планшетах. Клетки бактерий из ночной культуры центрифугировали и ресуспендировали в 50 (100) мл свежей среды до значения оптической плотности при $\text{OD}_{600} = 0.05$. Далее культуру выращивали при 37°C в колбах объемом 250 мл на качалке (ИБП РАН, Пушкино) при частоте вращения 150 об/мин до достижения фазы экспоненциального роста. Затем проводили пересев либо в 96-луночные планшеты, либо в колбы на 50/250 мл в зависимости от исследуемых параметров. Планшеты инкубировали на термощейкере ELMi Ltd Sky Line ST-3L (Латвия) при 150 об/мин и температуре 37°C.

Удельную скорость роста рассчитывали по формуле:

$$\mu = \frac{\ln \text{OD}_{t_2} - \ln \text{OD}_{t_1}}{t_2 - t_1},$$

где OD_{t_2} и OD_{t_1} – плотности культуры в моменты времени t_2 и t_1 соответственно, измеренные при длине волны 600 нм.

Определение минимальной ингибирующей концентрации проводили в 96-луночных планшетах методом серийных разведений на минимальной среде M9 с добавлением 0.15% глюкозы. Через 22 ч инкубации при 37°C плотность клеток (OD_{600}) в каждой лунке 96-луночного планшета измеряли с помощью спектрофотометра для микропланшетов Bio-Rad xMark. МИК определяли как самую низкую концентрацию вещества, которая полностью подавляет рост бактерий.

Определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) оценивали через 0, 30, 60 и 120 минут после добавления исследуемого вещества к культуре бактерий. Высев 5-го и

6-го десятикратных разведений проб производили на чашки Петри с 1.5% LB-агаром. Подсчет колоний проводили через 22 часа инкубирования.

Определение экспрессии генов проводили, измеряя активность фермента β -галактозидазы в клетках репортерных штаммов *E. coli*, несущих слияния гена *lacZ* с промоторами исследуемых генов, по методу Миллера (Miller, 1972), модифицированному для иммунологических планшетов (Smirnova et al., 2012).

Определение биопленкообразования осуществляли с использованием красителя кристаллического фиолетового. Бактерии при воздействии исследуемых веществ выращивали в планшетах. Инкубирование проводили в течение 22 часов при 37°C без перемешивания. Далее промытые физиологическим раствором биопленки подвергали окрашиванию 0.1% раствором кристаллического фиолетового в течение 30 минут в темноте. Краситель удаляли, лунки тщательно промывали дистиллированной водой. Прикрепившийся к биопленке краситель экстрагировали 96% этанолом. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 540 нм.

Общее биопленкообразование (ОБ) или массу биопленок рассчитывали по формуле: $ОБ = OD_{п} - OD_{к}$,

где $OD_{п}$ – это OD_{540} окрашенных биопленок, а $OD_{к}$ – это OD_{540} окрашенного контроля.

Для определения удельного биопленкообразования (УБ) значения ОБ делили на соответствующие значения OD_{600} над биопленками после 22-часовой инкубации.

Определение уровня внеклеточного глутатиона проводили с помощью метода рециркуляции 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (DTNB) - глутатионредуктазы.

Изменение мембранного потенциала определяли с помощью проникающего флуоресцентного красителя DiBAC4(3) (Wickens et al., 2000) с использованием микроскопа Leica DM2000.

Измерение парциального давления кислорода в среде культивирования определяли непосредственно в колбах полярографическим методом с использованием электрода Clarke InPro 6800 (Mettler Toledo, Швейцария). Для записи данных использовали контроллер dO_2/pH ферментера BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co., США).

Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона определяли с помощью сульфид-специфичного ионоселективного электрода XC-S2--001 (Сенсорные Системы, Россия) и электрода сравнения и компьютерного pH/иономера $srX-2$ (ИБП Пущино, Россия).

Радикалсвязывающую активность веществ определяли с использованием двух синтетических радикалов. В первом случае оценивали способность веществ предотвращать разрушение флуоресцеина радикалами AAPH, которые образуются из 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида при 37°C. Детекцию сигнала проводили на микропланшетном ридере INFINITE M1000 Pro (TECAN) при длине волны возбуждения – 485 нм, эмиссии – 520 нм. Во втором случае оценивали способность веществ связываться с радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH). Результат оценивали по изменению оптической плотности раствора, измеренной при длине волны 517 нм на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec Plus.

Определение способности веществ к аутоокислению с образованием перекиси водорода проводили с использованием пероксидазы хрена и красителя Amplex Red (AR/HRP). Содержание H_2O_2 в пробах измеряли на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (λ_{ex} 563 нм и λ_{em} 587 нм).

Секвенирование микробиома кишечника крыс. Образцы кала собирали до начала введения исследуемых веществ животным и спустя 14 дней введения с использованием метаболических клеток (TSE Systems). Хранение образцов осуществляли в лизирующем буфере в морозильной камере при -20 °C. Тотальную ДНК выделяли на приборе для автоматического выделения нуклеиновых кислот Magna Pure (Roche, Швейцария) с использованием реагентов MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) в режиме парно-концевых

прочтений. Данные секвенирования анализировали с использованием MiSeq Reporter (Illumina, США).

Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения DADA2. Была проведена фильтрация по качеству и длине ридов, было проведено устранение ошибок (denoising) и выделение ампликонных вариантов (ASV, amplicon sequence variant). Далее ASV были аннотированы по базе 16S, Silva 138.1, проведено нормирование по длине ридов. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета ALDEx2.

Статистическая обработка результатов. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 7. Были рассчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего исходя из результатов как минимум трех независимых измерений. Достоверность различий двух средних величин вычислялась на основании t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0.05$. Достоверность различий для двух выборок при анализе данных секвенирования микробиома кишечника крыс определяли на основании расчета критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Также проводили множественный регрессионный анализ посредством расчета коэффициента корреляции Спирмена (R). При $0.7 \leq R^2 \leq 1$ корреляция считалась высокой, при $0.4 \leq R^2 < 0.7$ – средней, при $R^2 < 0.4$ – низкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые вещества относятся к четырем группам (их общие структуры представлены на рисунке 1). Все они содержат базовый дикетонаминовый фрагмент. Тип заместителей вокруг структурного фрагмента ядра, а также его жесткость/гибкость и стереоизомерия вокруг двойной связи определяют различие структур (табл. 2).

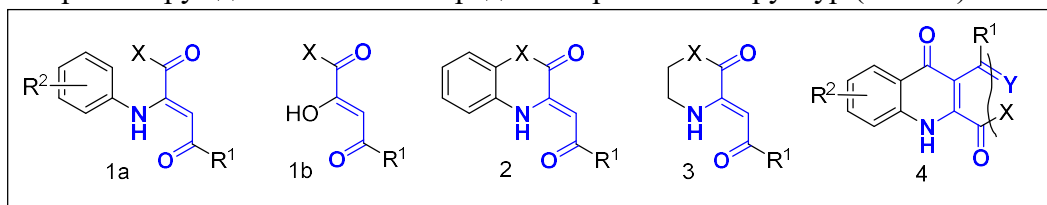


Рисунок 1. Общие структуры исследуемых веществ.

Радикалсвязывающая активность и минимальные ингибирующие концентрации исследуемых веществ.

Исследование радикал-связывающей активности (РСА) веществ проводили с использованием двух широко применяемых тестовых систем на основе радикалов DPPH и AAPH.

РСА соединений, определяемая по их способности связывать радикал DPPH, сильно различалась для представителей разных групп (табл. 2). Предполагается, что в данном тесте реализуется смешанный механизм действия: перенос водорода (HAT) и перенос одного электрона (SET) (Munteanu & Apetrei, 2021). Более выраженная радикалсвязывающая активность соединений группы 2 по сравнению с их близкими аналогами, соединениями группы 3, не содержащими аннелированного фенильного кольца, с промежуточными значениями для соединений группы 1a, может свидетельствовать о вкладе в эффективность связывания радикалов DPPH наличия длинной сопряженной системы, предпочтительно планарной геометрии, характерной для таких структур (Aliev et al., 2000). С этим предположением согласуется и тот факт, что единственным соединением группы 4, проявившим активность в тесте с DPPH, является CBR-376, который, в отличие от других представителей группы 4, содержит дополнительный аннелированный цикл, т.е. более эффективную сопряженную систему.

Способность соединений предотвращать деградацию флуоресцеина пероксильными радикалами в тесте с AAPH была высокой для всех соединений из групп 1, 2 и 3 (табл. 2), кроме CBR-368 из группы 1, который содержит электроноакцепторную группу COOC_2H_5 в

енаминном фрагменте и оказался неактивным. Из группы 4 только соединение CBR-376 проявило активность в отношении радикалов ААРН $\cdot$.

В тест-системе, в которой в качестве инициатора образования радикалов используется ААРН, реализуется механизм переноса атома водорода (НАТ) (Gulcin, 2020; Liang & Kitts, 2014). В этом тесте различия в значениях радикал-связывающей активности соединений первых трех групп были значительно менее выражены, чем в DPPH-тесте (табл. 2).

Антимикробную активность веществ определяли по значению их минимальной ингибирующей концентрации (МИК) по стандартной методике. МИК исследуемых веществ при обработке *E. coli* BW25113 была значительно выше, чем для известных антибиотиков (Andrews, 2001) и определялась только для 6 соединений (табл. 2). Наименьшими значениями МИК обладают соединения CBR-386 и CBR-376. В группе 2, к которой относится соединение CBR-386, было наибольшее количество веществ с низким значением МИК по сравнению с другими группами. Для ряда соединений при определении МИК ограничительным фактором стала их плохая растворимость. Для представителей 1, 2 и 4 групп за исключением 3 соединений было характерно высокое значение концентрации, не ингибирующей рост клеток. Примечательно, что в группе 1 более низкие значения МИК показали соединения группы 1b - CBR-371 и CBR-352, содержащие гидроксильную группу вместо ариламинной группы в положении 2.

Изменение ростовых характеристик бактерий *E. coli* при воздействии исследуемых веществ.

Исследуемые соединения по-разному влияли как на скорость роста и накопление биомассы бактерий, так и на количество колониеобразующих единиц (Рис. 2, 3А). Накопление биомассы в культурах *E. coli* BW25113 при действии 0.5 мМ CBR-366 и CBR-371 (Группа 1) снижалось по сравнению с культурой, обработанной только ДМСО, на 36 и 68%, соответственно. Ингибирование скорости роста бактерий при действии CBR-371 имело двухфазный характер (Рис. 2Б). К концу культивирования скорость роста культуры, обработанной CBR-366, была такой же, как и при обработке ДМСО, в то время как у бактерий, обработанных CBR-371, скорость роста была в 3.3 раза меньше. Бактериостатическое действие CBR-371 подтверждается снижением уровня КОЕ в 2 раза (Рис. 3А). Не отмечено влияния CBR-366 на колониеобразующую способность бактерий.

Из трех веществ группы 2 наименьшее накопление биомассы наблюдалось при действии 0.5 мМ CBR-384 (снижение на 40 %). Через 15 мин после добавления CBR-384 наблюдалась кратковременная остановка роста. Одновременно, у бактерий, обработанных CBR-384, наблюдалось достоверное снижение значения КОЕ по сравнению с ДМСО в 5.7 раз ($P < 0.05$) (Рис. 3А). В совокупности, результаты свидетельствуют о бактериостатическом действии CBR-384 на растущие *E. coli*. Кратковременное снижение скорости роста происходило также при действии 0.25 мМ CBR-386, но, как и CBR-288 (0.1 мМ), это вещество не влияло на значение КОЕ (Рис. 3А).

Таблица 2

Радикалсвязывающая активность и минимальные ингибирующие концентрации (МИК) исследуемых веществ

Группа 1a	R ¹	R ²	X		AAPH (50 мкМ), %	DPPH (1 мМ), %	МИК, мМ
CBR-368	Ph	n- COOEt	OMe		Nd ^R	26,5±6,3	>2
CBR-350	<i>n</i> -C ₂ H ₅ OC ₆ H ₄	H	OMe		79,9±1,2	27,1±2,1	>4
CBR-76	<i>n</i> -C ₂ H ₅ OC ₆ H ₄	2,4-Me ₂	OMe		79,7±4,6	21,3±2	>5
CBR-367	<i>n</i> -BrC ₆ H ₄	2,4-Me ₂	OMe		72,5±5,5	20,7±1,9	>4
CBR-366	t-Bu	n-Br	OMe		84,2±4	19±2,1	>10
Группа 1b	R ¹		X				
CBR-371	<i>n</i> -MeC ₆ H ₄		OMe		60,6±3,6	46,9±1,5	1
CBR-352	Ph		<i>n</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ NH		56,2±1,9	59,2 ±1,2	0,5
Группа 2	X	R1					
CBR-288	O	n-FC ₆ H ₄			50,2±1,7*	74,8±0,8**	1
CBR-384	O	t-Bu			87,5±1,3	69±0,5**	0,5
CBR-385	O	C ₆ H ₅			81,2±6,2	71,4±1,9**	Nd ^M (>0,125)
CBR-386	O	Me			88,5±1,8	78±0,1**	0,25
CBR-64	NC ₆ H ₅	p-Cl-C ₆ H ₄			44,3±9,9	53±1**	Nd ^M (>0,5)
Группа 3	X	R1					
CBR-123	N-Me	<i>n</i> -MeC ₆ H ₄			94±5,6	2,3±0,3	>4
CBR-124	N-Me	<i>n</i> -ClC ₆ H ₄			73±1,9	1,5±0,3	>4
CBR-125	NH	<i>n</i> -ClC ₆ H ₄			82,3±1,7	5,2±0,7	>4
CBR-382	O	<i>n</i> -ClC ₆ H ₄			81,7±1,9	2,4±0,4	>4
CBR-324	O	<i>n</i> -MeC ₆ H ₄			80,1±2,8	1,5±0,3	>4

Продолжение Таблицы 2.

Группа 4	R ¹	X	Y	R ²	AAPH (50 мкМ), %	DPPH (1 мМ), %	МИК, мМ
CBR-160A	t-Bu	COOMe	O	6-Br	Nd ^R	1,6±0,6	Nd ^M (>1)
<u>CBR-11</u>	Ph	COOMe	O	H	Nd ^R	0,7±0,5**	Nd ^M (>0,25)
CBR-41	Ph	COOMe	O	6-Me	Nd ^R	0,7±0,3	>4
CBR-383	Ph	COOMe	O	6-Br	Nd ^R	1,1±0,3	Nd ^M (>0,125)
CBR-266	Ph	H	O	H	Nd ^R	0,9±0,5	>4
CBR-272	Ph	COOMe	NOMe	H	Nd ^R	0,9±0,3	>4
CBR-375	Ph	COOMe	NOMe	8-Me	Nd ^R	3,1±1,3	4
CBR-379	Ph	H	NCH ₂ Ph	6-Me	Nd ^R	9,2±0,7	>2
<u>CBR-376</u>	Ph			H	16,3±1,2	76,7±3,5	0,25

Примечания:

Концентрация исследуемых веществ в тесте с ААРН– 50 мкМ, в тесте с DPPH – 1 мМ.

* - исследуемая концентрация составляла 10 мкМ

** - исследуемая концентрация составляла 0,5 мМ

Nd^M – МИК не была определена из-за низкой растворимости веществ

Nd^R – радикалсвязывающая активность не обнаружена

Изменение ростовых характеристик бактерий *E. coli* при воздействии исследуемых веществ.

Исследуемые соединения по-разному влияли как на скорость роста и накопление биомассы бактерий, так и на количество колониеобразующих единиц (Рис. 2, 3А). Накопление биомассы в культурах *E. coli* BW25113 при действии 0.5 мМ CBR-366 и CBR-371 (Группа 1) снижалось по сравнению с культурой, обработанной только ДМСО, на 36 и 68%, соответственно. Ингибирование скорости роста бактерий при действии CBR-371 имело двухфазный характер (Рис. 2Б). К концу культивирования скорость роста культуры, обработанной CBR-366, была такой же, как и при обработке ДМСО, в то время как у бактерий, обработанных CBR-371, скорость роста была в 3.3 раза меньше. Бактериостатическое действие CBR-371 подтверждается снижением уровня КОЕ в 2 раза (Рис. 3А). Не отмечено влияния CBR-366 на колониеобразующую способность бактерий.

Из трех веществ группы 2 наименьшее накопление биомассы наблюдалось при действии 0.5 мМ CBR-384 (снижение на 40 %). Через 15 мин после добавления CBR-384 наблюдалась кратковременная остановка роста. Одновременно, у бактерий, обработанных CBR-384, наблюдалось достоверное снижение значения КОЕ по сравнению с ДМСО в 5.7 раз ($P < 0.05$) (Рис. 3А). В совокупности, результаты свидетельствуют о бактериостатическом действии CBR-384 на растущие *E. coli*. Кратковременное снижение скорости роста происходило также при действии 0.25 мМ CBR-386, но, как и CBR-288 (0.1 мМ), это вещество не влияло на значение КОЕ (Рис. 3А).

Обработка *E. coli* веществами CBR-124 (0.5 мМ) и CBR-125 (0.25 мМ), принадлежащими к группе 3, не влияла на накопление биомассы, скорость роста и КОЕ (Рис. 3А). CBR-382 (0.5 мМ), также не влияло на накопление биомассы, но вызывало кратковременное снижение скорости роста на 60 мин культивирования и повышало значение КОЕ по сравнению с контролем на 20% (Рис. 3А).

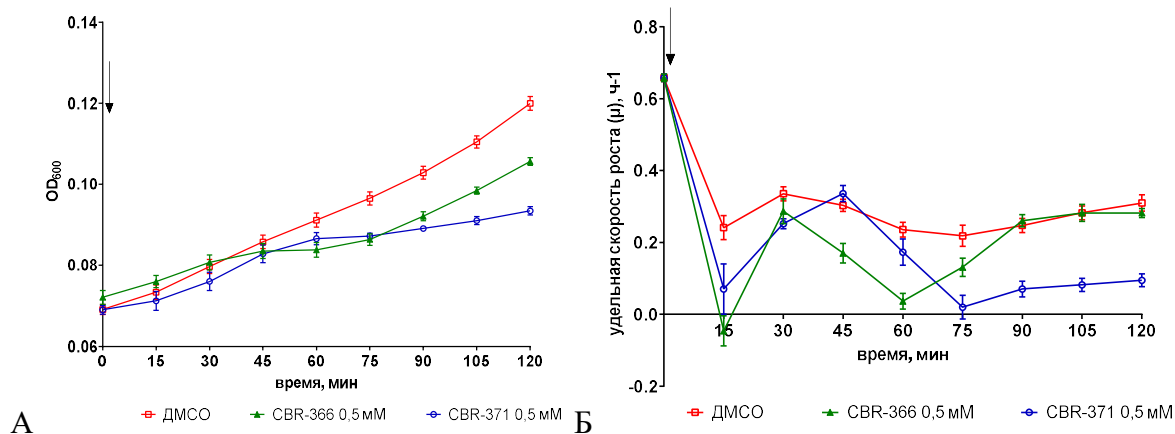


Рисунок 2. Влияние веществ 1 группы на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) *E. coli* BW25113 в планшетах. Стрелки показывают момент добавления вещества.

0.25 мМ CBR-11 из группы 4 не оказывало влияния на накопление биомассы, скорость роста и КОЕ. CBR-376 (0.25 мМ), принадлежащее к этой же группе, не влияло на первые два показателя, но снижало КОЕ по сравнению с клетками, обработанными ДМСО, в 2.5 раза (Рис. 3А).

Установлено, что обработка веществами CBR-371, CBR-384, CBR-386 и CBR-124 снижала способность *E. coli* BW25113 образовывать биопленки по сравнению с ДМСО в 1.7, 2.7, 1.6 и 2.5 раз, соответственно (Рис. 3Б). Как указано выше, первые два вещества оказывали также бактериостатическое действие.

Наличие генотоксического действия у веществ оценивали с использованием генноинженерного штамма *E. coli* NM3012, несущего транскрипционное слияние гена *sulA*,

являющегося медиатором филаментации в SOS-ответе, с геном *lacZ* (Quillardet et al., 1982). Было установлено, что ни одно из исследованных соединений не увеличивало экспрессию гена *sulA*, что свидетельствует об отсутствии у них генотоксического действия.

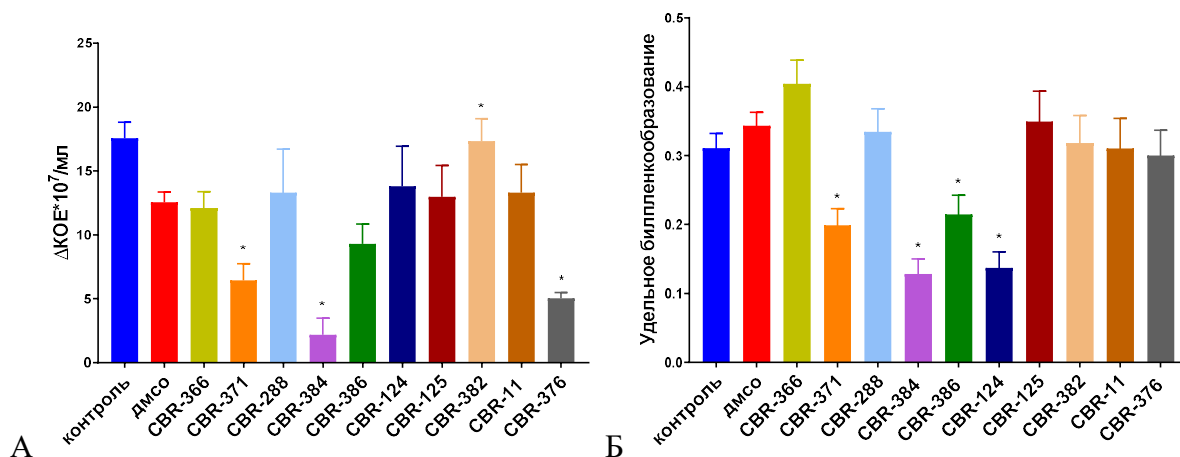


Рисунок 3. А - Изменение КОЕ через 2 часа после добавления исследуемых веществ в растущую культуру *E. coli* BW25113. Б - Удельное биопленкообразование *E. coli* BW25113 при действии исследуемых веществ. * - значения достоверно отличаются от ДМСО ($p < 0.05$).

Прооксидантная и антиоксидантная активность исследуемых веществ.

Прооксидантную активность 6 веществ, относящихся ко второму (CBR-288, CBR-384, CBR-386) и третьему (CBR-124, CBR-125, CBR-382) классам, изучали в двух тест-системах. В первом случае оценивали способность соединений продуцировать пероксид водорода при аутоокислении с использованием флуорофора AmplexRed с пероксидазой хрена. Было установлено, что исследуемые вещества не способны продуцировать перекись водорода.

Второй тестовой моделью служил генно-инженерный штамм бактерий *E. coli* NM3021, несущий генное слияние *katG::lacZ*. Наличие прооксидантной активности обнаруживается по увеличению экспрессии гена *katG*, который кодирует каталазу HPI. При воздействии исследуемых веществ на бактерии изменения экспрессии гена *katG* не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии у них прооксидантного действия.

Антиоксидантное действие 6 указанных ранее соединений оценивали по их способности снижать ингибирующее действие перекиси водорода на рост бактерий *E. coli* NM3021 в колбах.

Добавление 2 mM H_2O_2 в растущую культуру NM3021 вызывало обратимое ингибирование скорости роста бактерий (Рис. 4).

В условиях активной аэрации CBR-384 вызывал необратимое снижение скорости роста бактерий в 8 раз. При действии на бактерии, обработанные веществом, перекиси водорода наблюдалось уменьшение ингибирующего действия CBR-384 (Рис. 4А).

Влияние CBR-386 на скорость роста носило двухфазный характер (Рис. 4Б). Таким образом, при культивировании в колбах CBR-386, как и CBR-384, оказывал выраженное бактериостатическое действие, но, в отличие от CBR-384, добавление H_2O_2 в присутствии CBR-386 не снижало ингибирующее действие этого вещества, при этом CBR-386 усиливало бактериостатическое действие H_2O_2 (Рис. 4Б). При уменьшении концентрации данных веществ в 10 раз наблюдалось снижение их ингибирующего действия на бактерии и отсутствие влияния на ингибирующее действие перекиси водорода.

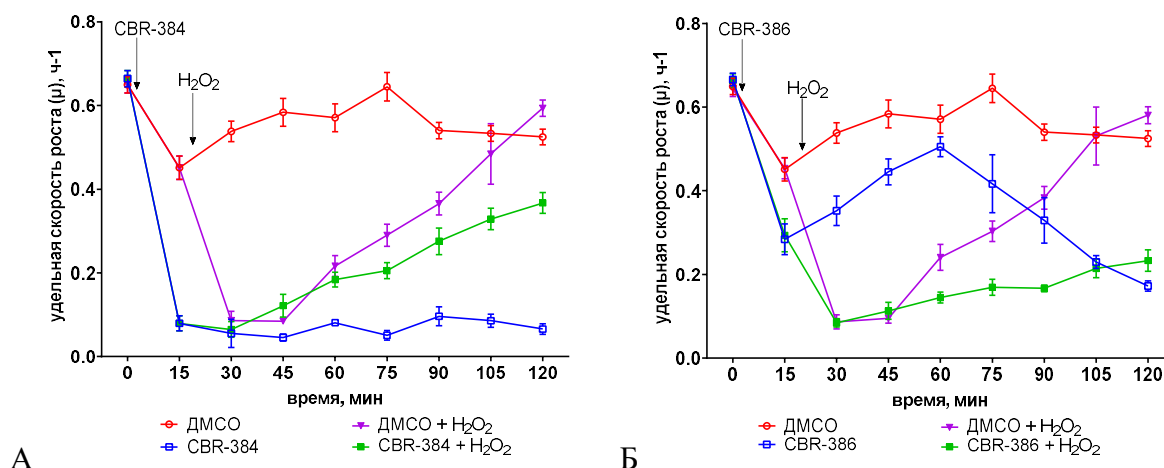


Рисунок 4. Влияние CBR-384 (А), CBR-386 (Б) и H₂O₂ на скорость роста бактерий *E. coli* NM3021, растущих в колбах.

Присутствие в среде CBR-124, CBR-125, CBR-288 и CBR-382 не оказывало заметного эффекта на ростовые параметры *E. coli* NM3021, растущих в колбах, как в отсутствие, так и в присутствии перекиси водорода.

Ответ энергодающих систем *E. coli* на воздействие CBR-384 и CBR-386.

Для изучения влияния CBR-384 и CBR-386 на дыхание бактерий было оценено изменение содержания растворенного кислорода в растущей культуре *E. coli* BW25113 при действии этих веществ, в концентрациях равных МИК. Парциальное давление кислорода (dO₂) измеряли непосредственно в колбах полярографическим методом с помощью электрода Кларка (Tyulenev et al., 2018).

Накопление биомассы в растущей аэробной культуре *E. coli* сопровождалось постепенным снижением растворенного кислорода, связанным с его потреблением в процессе дыхания. Добавление CBR-384 приводило к быстрому и необратимому повышению уровня кислорода в среде (Рис. 5А), что свидетельствовало о снижении дыхательной активности клеток. Изменение концентрации растворенного кислорода при действии CBR-386 имело двухфазный характер: возрастание концентрации соответствовало фазам снижения скорости роста культуры.

Цитоплазматическая мембрана бактериальных клеток является структурой, выполняющей ряд важных функций, прежде всего транспорт веществ и поддержание электрохимического градиента протонов. Диссипация мембранного потенциала может рассматриваться как один из маркеров вредного действия факторов внешней среды. Изменение мембранного потенциала при действии соединений CBR-384 и CBR-386 в концентрациях, равных ½ МИК, оценивали с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя DiBAC4(3) (Smirnova et al., 2015).

В отсутствие какой-либо обработки доля флуоресцирующих клеток в культуре *E. coli* BW25113 составляла не более 2% и не менялась в процессе роста в периодической культуре. При действии CBR-384 и CBR-386 доля флуоресцирующих клеток увеличивалась по сравнению с контролем (хотя и в небольшой степени), что эквивалентно снижению мембранного потенциала (Рис. 5Б).

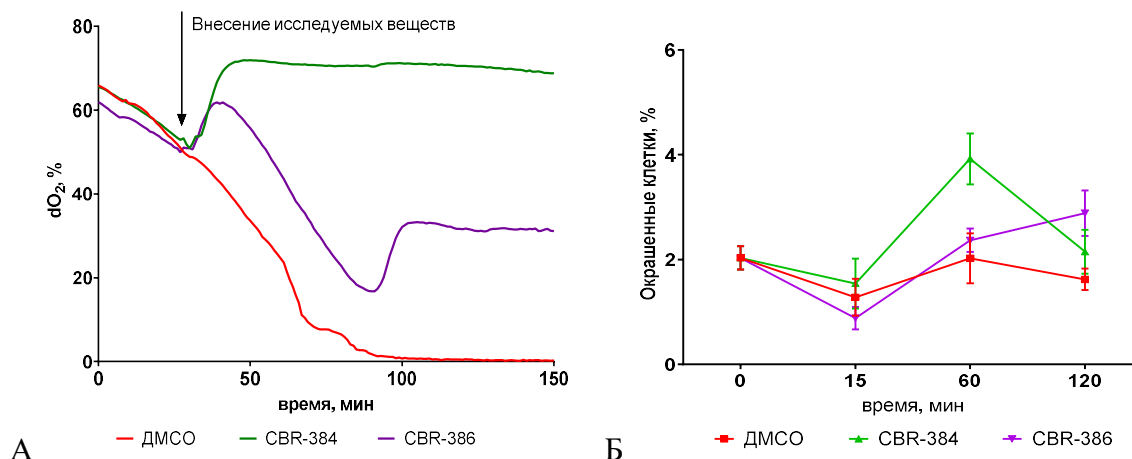


Рисунок 5. А - Влияние CBR-384 и CBR-386 на содержание растворенного кислорода в культуре *E. coli* BW25113. Б - Изменение доли клеток *E. coli* BW25113, окрашенных DiBAC4(3), от общего числа клеток при действии исследуемых веществ.

Ранее было обнаружено, что обработка *Mycobacterium tuberculosis* веществами, подобными CBR-384, снижает активность фермента MenB (Liu et al., 2010), участвующего в синтезе менахинона, одного из компонентов дыхательной цепи, что позволяет рассматривать эти вещества как перспективные противотуберкулезные препараты.

В связи с этим были проведены эксперименты по изучению влияния CBR-384 и CBR-386 на ростовые параметры нокаут мутантов *E. coli* JW3901, с делецией по менахинону (*menA*), и JW5713, с делецией по убихинону (*ubiC*), а также с делециями по субъединицам фермента АТФазы (*atpA*, *atpB*, *atpC* и *atpE*). Выращивание бактерий проводили в колбах, используя концентрации исследуемых веществ равные $\frac{1}{2}$ МИК.

Как в отсутствие каких-либо воздействий, так и при обработке CBR-384 и CBR-386, не отмечено статистически значимых различий в значениях ростовых параметров между родительским штаммом *E. coli* BW25113 и мутантом JW3901 (*menA*). В этих же условиях, у *E. coli* JW5713 (*ubiC*) начальная скорость роста и OD_{600} к концу культивирования были примерно на 30% ниже, чем у родительского штамма. При действии CBR-384 и CBR-386, наличие мутации *ubiC* снижало степень ингибирования роста по сравнению с родительским штаммом. Это может быть следствием более низкой скорости роста мутанта *ubiC* в момент воздействия исследуемых веществ.

В культурах, необработанных испытуемыми веществами (контроль), наличие мутаций *atpA*, *atpB*, *atpC* и *atpE* снижало накопление биомассы на 20-30%. Обработка CBR-384 и CBR-384 приводила к одинаковому снижению накопления биомассы, как у бактерий родительского штамма, так и у всех мутантов. В то же время, у всех мутантов при действии CBR-384 наблюдалось более низкое снижение скорости роста, в начале и середине культивирования. Этот эффект может быть связан с более низкой скоростью роста данных мутантов в момент воздействия CBR-384. При действии CBR-386 не выявлено достоверной разницы в изменении ростовых параметров у родительского штамма и мутантов.

В целом, мы не получили достаточных доказательств того, что бактериостатическое действие CBR-384 может быть связано с его влиянием на дыхательную систему *E. coli*.

У *E. coli*, как и у других грамотрицательных бактерий, глутатион (GSH) выполняет роль главного редокс-буфера. Было показано, что при некоторых стрессовых воздействиях, сопровождающихся ингибированием роста, в культурах *E. coli* наблюдается значительное повышение внутри- и внеклеточного глутатиона (Smirnova et al., 2015).

Исследование действия CBR-384 и CBR-386 проводилось на двух штаммах бактерий *E. coli* – BW25113 (*wt*) и JW2669. JW2669 является мутантом с делецией по гену *recA*, регулятору SOS-ответа. Ранее было обнаружено, что если в родительском штамме *E. coli* значительное увеличение внеклеточного глутатиона наблюдается только при стрессовом воздействии, то в

мутанте *recA*, вытекание GSH происходит в течение всего времени культивирования по мере накопления биомассы (Smirnova et al., 2022).

В наших условиях, CBR-384 и CBR-386 увеличивали уровень внеклеточного глутатиона при действии на родительский штамм, но не на мутант JW2669 (рис 26). Наибольшее увеличение внеклеточного глутатиона по сравнению с контролем наблюдалось в фазе быстрого ингибирования роста (Рис. 6А).

Известно, что при росте *E. coli* на минимальных средах с глюкозой и сульфатом в качестве источника серы стресс-индуцируемые остановки роста сопровождаются увеличением в среде не только глутатиона, но и сульфид-ионов (Tyulenev et al., 2018). Представляло интерес исследовать, воспроизводится ли этот эффект при действии CBR-384 и CBR-386.

При действии CBR-384 на растущую культуру *E. coli* BW25113 наблюдалось значительное изменение потенциала сульфид-специфичного электрода, свидетельствующее об увеличении уровня внеклеточного сульфида и совпадающее по времени с моментом снижения скорости роста (Рис.6Б).

При действии CBR-386 наблюдался значительно меньший двухфазный выброс сульфида, чем при действии CBR-384, что соответствовало более низкому бактериостатическому действию первого вещества (Рис.6Б).

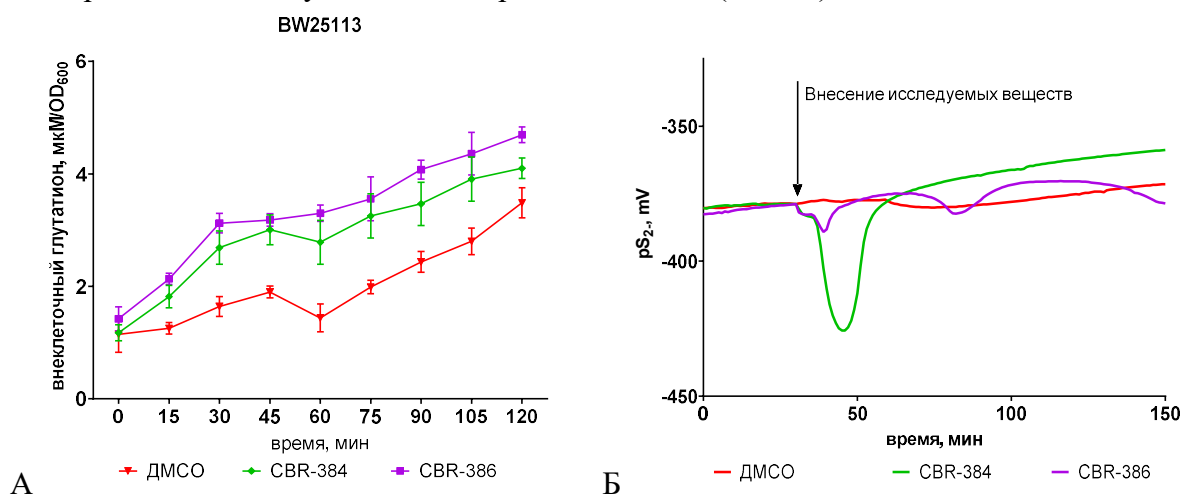


Рисунок 6. А - Уровень внеклеточного глутатиона при действии CBR-384 и CBR-386 на штамм *E. coli* BW25113. Б - Влияние CBR-384 и CBR-386 на концентрацию экстраклеточного сульфид-иона в растущей культуре *E. coli* BW25113.

Изменение микробиомного состава кишечника крыс под действием трех веществ.

Для изучения влияния веществ на микробиом кишечника крыс на основании проведенных исследований было выбрано три вещества. Соединения CBR-384 (2 группа) и CBR-376 (4 группа) обладают в отношении *E. coli* бактериостатическим действием. Известно также, что CBR-384 обладает противотуберкулезным действием (Stepanova et al., 2021). По данным авторов цитируемой работы, минимальная бактерицидная концентрация (МБК) CBR-384 в отношении бактерий *Mycobacterium tuberculosis* составила 5 мкг/мл. Соединение CBR-124 (3 группа) снижало способность бактерий образовывать биопленки. Таким образом, по сравнению с другими испытуемыми веществами, названные выше вещества обладали более высокой биологической активностью при действии на *E. coli*.

Оценку влияния исследуемых соединений на микробиом кишечника крыс проводили в рамках изучения их субхронической токсичности на лабораторных крысах линии Sprague Dawley. Секвенирование фрагментов гена 16S рРНК, полученных из фекалий крыс до начала введения исследуемых веществ, показало гетерогенность микробиомных сообществ разных особей. Большинство бактерий микробиомных сообществ ЖКТ крыс принадлежали к филумам *Firmicutes* (57%), *Verrucomicrobiota* (23%) и *Actinobacteriota* (9%).

После двухнедельного введения крахмальной слизи наблюдалось значимое изменение состава микробиомов даже на уровне филумов во всех группах. Так, в контрольной группе, получавшей крахмальную слизь, достоверно уменьшилось количество представителей филума *Patescibacteria* в 4,7 раза за счет бактерий рода *Candidatus saccharimonas*. Кроме того, у 5 из 6 животных, как минимум в 2 раза, наблюдалось уменьшение количества бактерий вида *Akkermansia muciniphila*, относящихся к филуму *Verrucomicrobia*. *Akkermansia muciniphila* играет ключевую роль в формировании микробного сообщества на границе слизистой оболочки и клеток кишечника человека, так как способна метаболизировать муцин (Derrien et al., 2017). По последним данным снижение количества этих бактерий в кишечнике коррелирует с развитием воспалительных процессов и нарушением обмена веществ в организме человека (Chen et al., 2023). В то же время, значительно увеличилось количество бактерий, относящихся к классу *Clostridia*, за счет представителей отрядов *Clostridia* UCG-014, *Oscillospirales* и *Monoglobales*.

Соединение CBR-384 наибольшее влияние оказало на бактерии вида *Akkermansia muciniphila* - их количество увеличилось в 3,6 раза. Также в среднем в 1,8 раза увеличилось количество бактерий семейства *Lactobacillaceae*, относящегося к классу *Bacilli* филума *Firmicutes*. Данные бактерии являются важными представителями сообщества молочнокислых бактерий кишечника и отвечают за превращение лактозы и других углеводов в молочную кислоту (Heeney et al., 2018). В то же время, CBR-384 вызвал достоверное снижение количества представителей классов *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* филума *Proteobacteria* в 16 и 10 раз, соответственно. Стоит отметить, что при этом уменьшилось количество патогенных представителей *Gammaproteobacteria* *Stenotrophomonas maltophilia* в 12 раз и *Shigella* в 10 раз. Кроме патогенов, CBR-384 вызвал уменьшение количества некоторых бактерий – представителей нормальной микрофлоры кишечника: в 4 раза снизилось количество бактерий, относящихся к семейству *Eggerthellaceae* класса *Coriobacteriia* и в 2,3 раза бактерий, относящихся к семейству *Lachnospirales* класса *Clostridia*.

При действии CBR-376 на микробиом кишечника крыс, в отличие от контрольной группы, наблюдалось сохранение количества бактерий *Akkermansia muciniphila* филума *Patescibacteria*. При этом в 12,9 раз уменьшилось количество представителей рода *Lachnospiraceae* UCG-006. Под действием данного вещества произошло увеличение количества бактерий рода *Lactobacillus* в 10 раз и бактерий класса *Vampirivibrionia* в 5 раз. Кроме того, наблюдалось увеличение количества представителей класса *Gammaproteobacteria*, которое произошло за счет семейств *Xanthomonadaceae* (в 2 раза), *Enterobacterales* (в 3 раза) и *Pseudomonadaceae* (в 10 раз). Так как среди представителей данного класса достаточно часто встречаются патогенные и условно-патогенные бактерии, увеличение количества таких бактерий, вероятно, стоит рассматривать как негативное событие.

В группе животных, получавших соединение CBR-124, наблюдались те же изменения микробиомного состава, что и в контрольной группе.

Расчет индексов альфа-биоразнообразия (индексы Шеннона, Симпсона, Chao1 и ACE) показал достоверное увеличение биоразнообразия на уровне семейств под действием соединения CBR-376. Индексы бета-разнообразия (индексы Жаккара и Брея-Кертиса) изменялись в широких пределах независимо от вводимого вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальной задачей является исследование влияния потенциальных лекарственных веществ на представителей микробиома кишечника. В настоящей работе представлены результаты изучения биологической активности трех групп оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов и их ациклических аналогов с использованием грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и лабораторных крыс.

Для фармпрепаратов, которые не рассматриваются как перспективные антимикробные агенты, обязательным и часто достаточным показателем их антимикробной активности является минимальная ингибирующая концентрация. Реже, имеется информация о действии препаратов на другие активности микроорганизмов, не связанные с прямым антимикробным действием.

В настоящей работе исследована биологическая активность оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов и их ациклических аналогов с использованием грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и лабораторных животных. Эти вещества рассматриваются как перспективные фармпрепараты.

На первом этапе были определены радикал-связывающая активность (РСА) с использованием DPPH и AAPH, а также минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для 26 веществ. Наиболее низкие значения МИК (от 0.25 до 1.0 мМ) выявлены для шести веществ, принадлежащих к 1, 2 и 4 группам. Эти значения были значительно выше, чем МИК известных антибиотиков. Для ряда соединений низкая растворимость в ДМСО не позволила определить значения МИК. Полученные данные свидетельствовали о том, что химическая структура существенно влияет на значения параметров, характеризующих свойства исследуемых веществ.

Известно, что значения минимальных ингибирующих концентраций дают лишь приблизительную характеристику антимикробной активности.

Учитывая результаты наших исследований и особенности структуры, 10 из 26 веществ, были взяты для дальнейших экспериментов, в ходе которых было исследовано их влияние на ростовые характеристики (накопление биомассы, скорость роста и колониеобразующую способность) бактерий *E. coli*, растущих на планшетах. Выявлены два вещества, оказывающие бактериостатическое действие. Первое из них (CBR-371) значительно снижало накопление биомассы, скорость роста и значение КОЕ. Второе (CBR-384) также снижало накопление биомассы, значение КОЕ и вызывало кратковременное торможение роста. Другие вещества оказывали либо слабо выраженное действие, либо полное отсутствие влияния на ростовые показатели *E. coli*. Обращает внимание обнаружение кратковременного ингибирования роста некоторыми испытуемыми веществами. Одно из возможных объяснений может быть связано со способностью бактерий трансформировать эти вещества до менее токсичных продуктов. Способность бактерий к трансформации ксенобиотиков хорошо известна.

Из 10 испытанных соединений CBR-371, CBR-384, CBR-386 и CBR-124 снижали способность *E. coli* 25113 образовывать биопленки. Примечательно, что первые два вещества, как отмечено выше, оказывали также бактериостатическое действие. Следует отметить особое значение рассмотренных выше показателей для активности и выживания симбиотических бактерий, как в желудочно-кишечном тракте, так и в природных условиях. Одними из факторов успешной конкурентной борьбы нормальной микробиоты с патогенами являются как более высокая скорость размножения, так и высокая способность к образованию биопленок, препятствующих колонизации ЖКТ другими микроорганизмами, включая патогены.

Если рассматривать испытуемые вещества как перспективные фармпрепараты (не антимикробного действия), то отсутствие у них генотоксического и оксидантного (или прооксидантного) действия, в определенных случаях, может рассматриваться как положительное свойство, снижающее риск таких побочных эффектов, как канцерогенное или мутагенное действие. В то же время, известно, что продукция низких концентраций оксидантов определенными веществами может индуцировать антиоксидантную систему

кишечных бактерий, усиливая защиту хозяина от оксидантов (Smirnova et al., 2021). Испытуемые вещества не индуцировали экспрессию гена *katG*, кодирующего у *E. coli* каталазу HPI, что свидетельствует об отсутствии у них такой способности.

Часть экспериментов проводилась нами с бактериями *E. coli*, растущими в колбах с интенсивным перемешиванием. Было обнаружено, что CBR-384 и CBR-386 в этих условиях обладают более сильным бактериостатическим действием, чем при культивировании в планшетах. В первом случае аэробные условия, способствующие протеканию окислительных процессов, в процессе роста поддерживаются более длительное время. В планшетах клетки большую часть культивирования находятся в микроаэробных условиях, создающих более редуцирующие условия. Выше обращалось внимание на возможность трансформации испытуемых веществ с участием окислительных реакций, с образованием продуктов с измененной биологической активностью.

В ходе испытания CBR-384 и CBR-386 на антиоксидантную активность против действия H_2O_2 , было обнаружено, что присутствие этих веществ в среде не только не снижало, но наоборот, усиливало бактериостатическое действие оксиданта. С другой стороны, добавление H_2O_2 после CBR-384 значительно снижало его ингибирующее действие на рост. В совокупности, эти и другие, рассмотренные выше результаты, усиливают гипотезу о возможной трансформации испытуемых веществ с участием окислительных реакций, а также указывают на важную роль условий культивирования в биологической активности испытуемых веществ. В связи с этим, следует отметить, что, будучи факультативным анаэробом, *E. coli* в своем жизненном цикле может успешно размножаться, как в аэробных (окружающая среда), так и в анаэробных или микроанаэробных условиях (ЖКТ). В первом случае, этому соответствуют условия на ранней стадии, во втором - на поздней стадии культивирования.

Слежение за изменениями параметров растущей культуры *E. coli* показало, что действие CBR-384 и CBR-386 сопровождается повышением уровня кислорода в среде. Очевидной причиной этому могло быть снижение потребления кислорода вследствие ингибирования роста бактерий. Однако возможна обратная связь между изменениями двух параметров: ингибирование роста является следствием ингибирования дыхания испытуемыми веществами. На эту возможность указывают данные о том, что вещества, подобные CBR-384, снижают активность фермента MenB, участвующего в синтезе менахинона, одного из компонентов дыхательной цепи.

В наших условиях, мутант *E. coli menA* с делецией по менахинону при обработке CBR-384 или CBR-386 рос с такой же скоростью, как и родительский штамм. В то же время, мутант *ubiC*, дефектный по убихинону, показывал снижение бактериостатического действия при обработке CBR-384 и предотвращение действия CBR-386. Это может быть следствием более низкой скорости роста мутанта *ubiC* в момент воздействия исследуемых веществ. Воздействие CBR-384 и CBR-386 на мутантов по субъединицам АТФазы также показало снижение бактериостатического действия веществ, что может быть связано с более низкой начальной скоростью роста мутантов по сравнению с родительским штаммом.

Ранее в ЛФГМ было показано, что ингибирование роста *E. coli* при некоторых видах стресса сопровождается резким увеличением экстраклеточного уровня двух серусодержащих веществ, глутатиона и сульфида. Установлено, что эти реакции являются частью сложного механизма поддержания гомеостаза внутриклеточного цистеина, направленного на предотвращения окислительного стресса (Tyulenev et al., 2019). В наших условиях, этот эффект воспроизводился при действии на *E. coli* CBR-384 и CBR-386. В совокупности полученные данные указывают на то, что действие испытуемых веществ на растущие бактерии вызывает реакцию, типичную для бактериостатических агентов.

Особый интерес представляют результаты исследования действия ОАГ на микробиом лабораторных крыс. Нами впервые изучено влияние трех представителей ОАГ на микробиомный состав кишечника крыс. В настоящее время не вызывает сомнения влияние

микробиома на все аспекты здоровья человека. Необходимо накопление данных о роли различных факторов, в том числе, лекарственных препаратов, на активность микробиома.

Совокупность проведенных тестов позволила выявить вещества, обладающие бактериостатическим действием, исследовать вероятный механизм их действия, изучить влияние веществ на антиоксидантную и энергетическую системы бактерий. В результате изучения влияния наиболее интересных веществ на микробиомный состав кишечника лабораторных крыс было выявлено как вещество, оказывающее значительное влияние, так и вещество, не изменяющее бактериальный состав кишечника, что позволяет учитывать производимый эффект при разработке на базе данных веществ лекарственного средства.

ВЫВОДЫ

1. Из изученных химических соединений, относящихся к четырем группам, соединения второй группы обладают наибольшей радикал-связывающей активностью в химических тестах, однако не проявляют про- и антиоксидантных свойств в бактериальных тест-системах.
2. Наиболее низкие значения МИК (от 0.25 до 1.0 мМ) определены для семи ОАГ, принадлежащих к 1, 2 и 4 группам.
3. Обнаружены соединения (CBR-371 и CBR-384), обладающие наибольшей бактериостатической активностью. Эти два соединения, а также соединения CBR-124 и CBR-386, способны снижать биопленкообразование бактерий *E. coli*.
4. Соединения CBR-384 и CBR-386 способны ингибировать дыхательную активность и снижать мембранный потенциал клеток бактерий *E. coli*.
5. Ингибирование роста *E. coli* при действии CBR-384 и CBR-386 сопровождается увеличением уровня внеклеточного глутатиона и вытеканием сульфида при действии CBR-384, что является типичной реакцией на воздействие бактериостатических агентов.
6. Крахмальная слизь, используемая в качестве носителя при проведении доклинических исследований потенциальных лекарственных веществ, может оказывать значительное действие на микробиом кишечника лабораторных животных.
7. CBR-384 оказывает существенное влияние на микробиомный состав кишечника крыс: вещество вызывает увеличение количества бактерий рода *Akkermansia* и снижение количества представителей родов *Shigella* и *Stenotrophomonas*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Тюленев А. В. Real-time мониторинг физиологических параметров для изучения раннего ответа бактерий *Escherichia coli* на пероксидный стресс / А. В. Тюленев, Г. В. Смирнова, А. О. Габова, Г. А. Триандафилова, О. Н. Октябрьский // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2022. – В. 1. – С. 35-41. (ВАК)
2. Триандафилова Г. А. Влияние оксипроизводных азотсодержащих гетероциклов CBR-384 и CBR-386 на дыхательную активность и уровень внеклеточных серусодержащих соединений у бактерий *Escherichia coli* / Г. А. Триандафилова, А. В. Тюленев, Н. Г. Музыка, Г. В. Смирнова, О. Н. Октябрьский // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2023. – В. 4. – С. 367-374. (ВАК)
3. Triandafilova G. Antimicrobial and antioxidant activity of some nitrogen-containing heterocycles and their acyclic analogues / G. Triandafilova, G. Smirnova, O. Krasnykh, A. Boteva, O. Oktyabrsky // Indian J Microbiol. – 2024. – V. 64. – P. 482-491. <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01158-6> (Scopus, WoS)
4. Триандафилова Г. А. Исследование влияния оксипроизводных азотсодержащих гетероциклов на микробиом кишечника крыс / Г. А. Триандафилова, О. Н. Октябрьский // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2024. – В. 4. – С. 205-211. (ВАК)

Публикации в других журналах и сборниках

1. Триандафилова Г.А. Использование бактерии *Escherichia coli* в скрининге химических соединений в качестве модельного представителя микробиома кишечника человека / Г.А. Триандафилова, О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова, А.А. Ботева // Сборник тезисов 24-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА». – Пущино. – 2020. – С. 366.
2. Триандафилова Г.А. Влияние ряда азотсодержащих гетероциклических соединений на ростовые характеристики бактерий *Escherichia coli* / Г. А. Триандафилова, Г. В. Смирнова, А. А. Ботева, О.Н. Октябрьский // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2020». – Пермь. – 2020. – С. 259-262.
3. Триандафилова Г.А. Исследование влияния оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов на ростовые характеристики бактерий *Escherichia coli* для использования их в исследовании антиоксидантной активности веществ / Г.А. Триандафилова, Г.В. Смирнова, О.П. Красных, О.Н. Октябрьский // Сборник тезисов VII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VOLGAMEDSCIENCE» – Нижний Новгород. – 2021. – С. 116-118.
4. Триандафилова Г.А. Использование генно-модифицированного штамма бактерий *Escherichia coli* для исследования токсичности химических соединений / Г.А. Триандафилова // Сборник тезисов международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021», секция «Микробиология». – Москва. – 2021.
5. Триандафилова Г.А. Влияние оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов на бактерии *Escherichia coli* / Г.А. Триандафилова, Г.В. Смирнова, А. В. Тюленев, О. Н. Октябрьский // Тез. докл. 3-го Российского микробиологического конгресса 2021. – Псков. – 2021. – С. 119.
6. Триандафилова Г.А. Действие оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов на мутанты *Escherichia coli menA* и *ubiC* // Г.А. Триандафилова, А. В. Тюленев, О. П. Красных, Г. А. Смирнова, О. Н. Октябрьский // Сборник материалов VII Пушинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино. – 2021. – С. 191-193.
7. Триандафилова Г.А. Влияние производных 1,4-бензоксазин-2-она на дыхательную цепь бактерий *Escherichia coli* / Г.А. Триандафилова, Г.В. Смирнова, А. В. Тюленев, О.Н. Октябрьский // Сборник тезисов 25-ой Пушинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА». – Пущино. – 2022. – С. 47-48.
8. Триандафилова Г.А. Исследование антиоксидантной и прооксидантной активности оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов с использованием микробной тест-системы / Г.А. Триандафилова, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Сборник тезисов VIII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VOLGAMEDSCIENCE». – Нижний Новгород. – 2022. – С. 46-48.
9. Триандафилова Г.А. Изменение бактериального состава кишечника крыс при исследовании субхронической токсичности трех веществ, представителей разных классов оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов / Г.А. Триандафилова, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Сборник тезисов 26-ой Пушинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА». – Пущино. – 2023. – С. 190-191.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат
 АТФ – аденозинтрифосфат
 АФК – активные формы кислорода
 ДМСО – диметилсульфоксид
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
 КОЕ – колониеобразующие единицы
 МИК – минимальная ингибирующая концентрация
 ОАГ - оксопроизводные азотсодержащих гетероциклов
 ОБ – общее биопленкообразование
 ОНФГ - *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид
 РСА – радикалсвязывающая активность
 УБ – удельное биопленкообразование
 ААРН – 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид
 ABTS - 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота
 AR – краситель Amplex Red
 ASV - amplicon sequence variant
 AUC – площадь под кривой
 DiBAC₄(3) - бис- (1,3-дибарбитуровая кислота)-триметиноксанол
 DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
 DTNB - 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота)
 GSH –глутатион
 НАТ - перенос атома водорода
 HRP - пероксидаза хрена
 NADH/NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 OD – оптическая плотность
 ORAC – oxygen radical absorbance capacity
 PBS – фосфатно-солевой буфер
 R - коэффициент корреляции Спирмена
 SD – линия Sprague Dawley
 SET – перенос одного электрона

ТРИАНДАФИЛОВА ГАЛИНА АНДРЕЕВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ОКСОПРОИЗВОДНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать __.__.2025 г.

Формат 60×90/16

Усл. Печ. Л. 1.

Тираж __ экз. Заказ.

Набор компьютерный

Отпечатано в