

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
«ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Триандафилова Галина Андреевна

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Октябрьский Олег Николаевич

Пермь – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Оксопроизводные азотсодержащих гетероциклов.....	14
1.2. Образование и действие активных форм кислорода.....	15
1.2.1. Окислительный стресс.....	16
1.2.2. Источники АФК	19
1.2.3. Антиоксиданты, методы исследования антиоксидантной активности веществ	21
1.3. Методы определения генотоксичности	24
1.3.1. Тест Эймса	25
1.3.2. Тест WP2	26
1.3.3. SOS-хромотест	27
1.3.4. Метод ДНК-комет.....	27
1.3.5. Микроядерный тест.	28
1.3.6. <i>Drosophila melanogaster</i>	29
1.4. Микробиом желудочно-кишечного тракта	30
1.4.1. Состав, функции.....	30
1.4.2. Взаимодействие с лекарствами	34
1.5. <i>Escherichia coli</i>	37
1.5.1. Роль в микробиоме человека	37
1.5.2. Антиоксидантная система <i>E. coli</i>	38
1.5.3. Дыхательная система <i>E. coli</i>	41
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Объекты исследования	45

2.2. Условия культивирования.....	46
2.3. Определение радикалсвязывающей активности (РСА)	46
2.3.1. РСА с ААРН.....	46
2.3.2. РСА с DPPH	47
2.4. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК).....	48
2.5. Определение удельной скорости роста.....	48
2.6. Определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ)	48
2.7. Определение активности β -галактозидазы.....	49
2.8. Определение биопленкообразования.....	50
2.9. Оценка влияния веществ на чувствительность бактерий к перекиси водорода	51
2.10. Определение способности веществ к аутоокислению с образованием перекиси водорода.....	51
2.11. Определение уровня внеклеточного глутатиона	52
2.12. Оценка изменения мембранного потенциала клеток	52
2.13. Измерение парциального давления кислорода и уровня внеклеточного сульфид-иона	53
2.14. Секвенирование микробиома кишечника крыс	53
2.15. Статистическая обработка результатов	57
ГЛАВА 3. РАДИКАЛСВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И МИНИМАЛЬНЫЕ ИНГИБИРУЮЩИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ (МИК) ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ ..	58
3.1. Радикалсвязывающая активность веществ.....	63
3.2. Антимикробная активность веществ.....	64
ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИЙ <i>E.</i> <i>COLI</i> ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ	66
4.1. Влияние веществ на ростовые параметры <i>E. coli</i> BW25113	67

4.2. Биопленкообразование бактерий <i>E. coli</i> BW25113 при воздействии исследуемых веществ	73
4.3. Генотоксическое действие исследуемых соединений.....	74
ГЛАВА 5. ПРООКСИДАНТНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ	76
5.1. Прооксидантная активность.....	76
5.2. Антиоксидантная активность исследуемых соединений.....	76
ГЛАВА 6. ОТВЕТ ЭНЕРГОДАЮЩИХ СИСТЕМ <i>E. COLI</i> НА ВОЗДЕЙСТВИЕ CBR-384 И CBR-386	82
6.1. Дыхательная активность бактерий при действии CBR-384 и CBR-386.....	82
6.2. Изменение мембранного потенциала бактерий при воздействии CBR-384 и CBR-386.....	83
6.3. Рост мутантных штаммов с делециями по компонентам дыхательной цепи при воздействии на них CBR-384 и CBR-386.....	85
6.4. Рост мутантных штаммов с делециями по АТФазе при воздействии на них CBR-384 и CBR-386	89
6.5. Влияние CBR-384 и CBR-386 на уровень внеклеточного глутатиона и сульфида.....	94
ГЛАВА 7. ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБИОМНОГО СОСТАВА КИШЕЧНИКА КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТРЕХ ВЕЩЕСТВ	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ	114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	115
СПИСОК ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ.....	117
ПРИЛОЖЕНИЕ А	140
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	146
ПРИЛОЖЕНИЕ В	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Несмотря на большое разнообразие лекарственных веществ, присутствующих на мировом рынке, поиск 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 колониеобразующих единиц микроорганизмов, большая часть которых является бактериями (Gholizadeh et al., 2019). Они играют важную роль в пищеварении, секреции полезных метаболитов, 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. Возможно усиление токсичности препарата, либо, наоборот, трансформация 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), рассматриваются как универсальные блоки для создания новых биологически активных молекул. 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 изучены радикалсвязывающие и антимикробные свойства 26 соединений, относящихся к оксопроизводным азотсодержащих гетероциклов и их ациклическим аналогам, с использованием микробных тест-систем и химических тестов. Выявлены соединения с высокой радикалсвязывающей активностью, а также ее связь с особенностями структуры (класса) исследуемых веществ.

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 вытеканием 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*.

Впервые показано существенное влияние CBR-384 на микробиомный состав кишечника крыс и отсутствие такового у 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 позволят 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* позволят 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.

При выполнении исследований использовались бактерии родительского штамма *Escherichia coli* BW25113 и созданные на его основе штаммы, несущие слияния промоторов генов *katG* 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 P1. Также были использованы штаммы с делециями по элементам дыхательной цепи – *ΔmenA*, *ΔubiC*, *ΔatpA*, *ΔatpC*, *ΔatpB*, *ΔatpE*, и штамм с делецией по элементу SOS-системы – *ΔrecA*. Экспрессию генов изучали,

определяя активность β -галактозидазы. За ростом бактерий следили путем измерения оптической плотности в 96-луночных полистирольных планшетах с использованием микропланшетного спектрофотометра xMark Bio-Rad либо на фотометре КФК-2 при выращивании культуры в колбах. Минимальную ингибирующую концентрацию антибиотиков измеряли в планшетах методом серийных разведений. Колониеобразующую способность бактерий определяли методом посева на твердый агар. Влияние веществ на образование биопленок оценивали с помощью кристаллического фиолетового. Радикалсвязывающую активность определяли по способности соединений связывать один из двух химических радикалов – ААРН или DPPH. В первом случае системой детекции служила флуоресценция флуоресцеина, во втором детекцию проводили спектрофотометрически. Перекись водорода измеряли на спектрофлуориметре с использованием красителя Amplex Red и пероксидазы хрена (AR/HRP). Изменение pO_2 определяли полярографическим методом с использованием электрода Кларка и комплекта измерительной аппаратуры. Уровень внеклеточного сульфид-иона определяли с помощью сульфид-специфичного ионоселективного электрода ХС-S²⁻001. Мембранный потенциал определяли с помощью флуоресцентного красителя DiBAC. Количество окрашенных клеток подсчитывали на флуоресцентном микроскопе Leica. Уровень внеклеточного глутатиона оценивали с помощью метода рециркуляции 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (DTNB) - глутатионредуктазы. Детекцию проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1700.

Основные 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.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность полученных результатов основана на проведении как минимум трех независимых измерений для каждого эксперимента с последующим расчетом средних значений и стандартных ошибок среднего. 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 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

Пушинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА», Пушкино, 2023.

Личное участие 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.

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. Солodникову С. Ю. за помощь в проведении экспериментов на лабораторных животных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Оксопроизводные азотсодержащих гетероциклов

К оксопроизводным азотсодержащих гетероциклов относятся несколько классов химических веществ, отличающихся заместителями в гетероциклических системах. Благодаря наличию нескольких сайтов модификации такие структуры обладают большим спектром различных видов биологической активности.

Особый интерес представляют гетероциклы, содержащие енаминовый фрагмент ($\text{N}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$). Такие молекулы рассматриваются как универсальные блоки для создания новых лекарств, так как сопряженная система ($\text{N}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$) обладает как нуклеофильными, так и электрофильными свойствами и образует высокореакционный центр (Amaye et al., 2021). Химические соединения, включающие енаминовый фрагмент, благодаря большому разнообразию структур, показывают широкий спектр биологических активностей.

Соединения, содержащие 4-хинолоновый фрагмент, широко используются в качестве антибактериальных препаратов (Kathrotiya & Patel, 2013; Michalak et al., 2017). Ключевым механизмом их действия является ингибирование ферментов ДНК-гиразы, топоизомераз II и IV, которое приводит к нарушению репликации ДНК и гибели бактерий. Несмотря на наличие на рынке лекарств четырех поколений хинолонов, в связи с ростом резистентности к ним поиск новых активных веществ, относящихся к данному классу, остается актуальной задачей. Основной упор делается на создание гибридных молекул (Gao et al., 2023). Была установлена высокая антибактериальная активность таких соединений против *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*, но противогрибковая активность не обнаружена (Ceylan et al., 2020).

Кроме хинолонов в качестве антимикробных агентов изучали и другие классы веществ, содержащие енаминовый фрагмент. Так, в работе Xiao и соавторов (Xiao et al., 2007) описаны результаты исследования антибактериальной и противогрибковой активности 24 енаминов. В отличие от хинолонов,

енаминоновый фрагмент в данных веществах не включен в гетероциклическую систему. Было установлено, что несколько веществ имеют значение МИК, сопоставимое с пенициллином, в отношении бактерий *S. aureus*. Ингибирующая активность исследованных веществ в отношении бактерий *B. subtilis*, *E. coli* и *Pseudomonas fluorescens*, а также грибов *Aspergillus niger*, *C. albicans* и *Trichophyton rubrum* была низкой.

Соединения бензоксазинового ряда, в которых енаминоновый фрагмент включен в гетероциклическую систему, показали высокую активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis* (Stepanova et al., 2021; Zampieri et al., 2019). Предполагается, что механизм их действия связан с ингибированием фермента MenB, участвующего в биосинтезе менахинона (Liu et al., 2010).

Для диссертационного исследования были выбраны 4 класса соединений, отличительной особенностью которых являются различная степень жесткости/гибкости связей енаминового фрагмента и разнообразие заместителей вокруг структурного фрагмента ядра.

1.2. Образование и действие активных форм кислорода.

Использование кислорода для дыхания есть неотъемлемая часть жизнедеятельности аэробных организмов. Побочным продуктом дыхательного процесса является образование активных форм кислорода (АФК), к которым относятся супероксидный анион ($O_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), синглетный кислород (1O_2) и гидроперекиси ($ROOH$). Кроме кислорода, активные формы образуют азот (АФА) - NO^{\cdot} , $ONOO^-$ и сера (Weidinger & Kozlov, 2015). Большинство АФК и АФА содержат неспаренные электроны и называются свободными радикалами. Известно, что такие соединения играют важную роль, как в нормальных физиологических, так и в патофизиологических процессах (Sun et al., 2020).

Образование низких уровней АФК необходимо для нормального физиологического функционирования клеток (Niki, 2018). АФК и АФА играют

важную роль в передаче сигналов внутри клетки, участвуют в регуляции противовоспалительного ответа, а также используются клетками иммунной системы для борьбы с патогенами (D'Autréaux & Toledano, 2007; Forrester et al., 2018; Ingram & Brighton, 2017; Weidinger & Kozlov, 2015). В эукариотических клетках активация редокс-чувствительных факторов транскрипции, таких как AP-1, p53 и NF- B10, регулирует экспрессию провоспалительных цитокинов и клеточную дифференциацию (Burton & Jauniaux, 2011). Активация внеклеточно-регулируемых киназ (ERK1/2), как правило, способствует выживанию и пролиферации клетки, в то время как стимуляция митоген-активируемых киназ (p38MAPK) и стресс-активируемых киназ (SAPK–JNK) приводит к апоптозу (Cindrova-Davies, 2009; Новиков et al., 2014). В клетках бактерий небольшие дозы АФК, образовавшихся под воздействием салицилата, способствуют образованию покоящихся форм (Wang et al., 2017). В бактериальных биопленках АФК способны индуцировать генетическую изменчивость, способствовать гибели клеток в определенных областях биопленки и, возможно, регулировать развитие самой биопленки ( ar et al., 2012).

1.2.1. Окислительный стресс

Окислительным стрессом называют чрезмерное накопление АФК, проявляющееся в виде потери сигнальной способности и неспецифического повреждения клеточных макромолекул, что способствует развитию различных патологий (Olson, 2020). Благодаря высокой реакционной способности, АФК могут повреждать все важные биологические макромолекулы (липиды, белки и нуклеиновые кислоты) и представляют потенциальную опасность, подвергая клетки окислительному стрессу (Sies, 2015; Yang & Lee, 2015).

Окислительный стресс отражает дисбаланс между уровнем АФК в организме и способностью антиоксидантных систем снижать уровень АФК до безопасного уровня и репарировать повреждения (Gutteridge & Halliwell, 2018; Nimse & Pal, 2015).

На клеточном уровне, когда белки подвергаются воздействию активных форм кислорода, происходят модификации боковых цепей аминокислот и, следовательно, изменяется структура белка. Прямое окисление боковых цепей ведет к образованию карбонильных групп (альдегидов и кетонов), а основными аминокислотами, подверженными воздействию, являются пролин, аргенин, лизин и треонин. Эти модификации приводят к функциональным изменениям, которые могут являться частью сигнального пути либо вызывать нарушения клеточного метаболизма. Так, одним из механизмов передачи сигнала посредством пероксида водорода является окисление тиольных групп в белках-мишенях (Sies & Jones, 2020) . Другой пример: окислительные процессы являются неотъемлемой частью процесса образования дисульфидных связей при фолдинге белков в ЭР. Побочным продуктом данной реакции является перекись водорода, за нейтрализацию которой отвечает глутатионпероксидаза 8 (GPx8) (Ramming et al., 2014). Снижение активности GPx8 может привести к нарушению редокс-гомеостаза и клеточной смерти. Также окислительное повреждение белков часто связано с реакцией между аминокислотами и радикалом ONOO^\cdot , приводящей к образованию нитрованных аминокислот, таких как нитротирозин (Cabiscol et al., 2000). Недавние исследования показали, что нитрование тирозинов в белках, ассоциированных с биомембранами, связано с процессом перекисного окисления липидов через реакцию, которая включает одноэлектронное окисление тирозина липидными пероксильными радикалами (LOO^\cdot) (Radi, 2013). В бактериальных клетках действию АФК наиболее подвержены металлоферменты, участвующие в основных клеточных процессах. $[\text{4Fe-4S}]$ дегидратазы класса аконитаз и моонуклеарные Fe (II) ферменты, такие как рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза, необходимы для функционирования ЦТК, пентозофосфатного пути, биосинтеза разветвленных и ароматических аминокислот. Эти семейства ферментов используют атомы железа для прямого связывания метаболитов. O_2^- и H_2O_2 способны окислять их металлические центры, которые диссоциируют, что приводит к дезактивации фермента (Imlay, 2013, 2019).

При воздействии АФК на молекулу нуклеиновой кислоты может происходить окисление как оснований, так и сахаров. Например, $\text{OH}\cdot$ окисляет гуанин до 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина. Воздействие АФК на остаток сахара может привести к разрыву нуклеиновой цепи либо к образованию кросс-сшивок, которые влияют на укладку хроматина, репарацию ДНК и процесс транскрипции (Halliwell & Gutteridge, 1999). Повреждение митохондриальной ДНК посредством окисления происходит в 5-10 раз чаще, чем ядерной. Это связано с пространственно близким образованием $\text{O}_2\cdot$ в электронно-транспортной цепи, а также отсутствием гистоновых белков и слабой системой репарации в митохондриях (Richter et al., 1988; Schniertshauer et al., 2023). Еще одной мишенью для АФК служат молекулы микроРНК. Их окислительные модификации могут приводить к изменению специфичности и нарушению работы всей клетки (Sies et al., 2017).

Гидроксильные радикалы способны инициировать перекисное окисление липидов в плазматических мембранах и любых других органеллах, которые содержат в больших количествах цепи полиненасыщенных жирных кислот. Данный процесс носит цепной характер и приводит к образованию в основном пероксильных и алкоксильных радикалов (Burton & Jauniaux, 2011). В результате изменяются липид-липидные взаимодействия, ионные градиенты, текучесть и проницаемость мембраны. Продукты цепной реакции (например, малоновый диальдегид) являются высокореакционноспособными и могут взаимодействовать с аминами белков и нуклеиновых кислот, вызывая образование аддуктов (Gaschler & Stockwell, 2017). Например, замещенные аддукты циклической ДНК способны ингибировать синтез прокариотических и эукариотических ДНК-полимераз. Кроме того, такие молекулы способны увеличивать количество мутаций: было установлено, что 4-гидроксиноненаль значительно увеличивает скорость мутаций в гене *lacZ* бактерий *E. coli* (Winczura et al., 2012). Большинство бактериальных липидов содержат только насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты, которые не склонны к перекисидации (Nichols & Mcmeekin, 2002). Однако, есть данные об увеличении степени перекисного окисления липидов в клетках *E. coli*

под действием наночастиц оксидов металлов (Dasari et al., 2013), что подтверждает возможность протекания таких процессов в бактериальных мембранах.

1.2.2. Источники АФК

В прокариотической клетке супероксидный анион образуется в цитоплазме как побочный продукт функционирования дыхательной цепи. Далее он подвергается спонтанной или ферментативной дисмутации с образованием пероксида водорода. Также пероксид водорода может образоваться за счет повторного одноэлектронного восстановления супероксидного радикала флавиновыми переносчиками дыхательной цепи (Ткаченко, 2012). Основными ферментами, при аутоокислении которых образуются АФК, являются НАДН-дегидрогеназа II и цитохромоксидазы (Messner & Imlay, 1999). Кроме того, фумаратредуктаза и конечная редуктаза способны вызвать окислительный стресс при переходе микроорганизмов от анаэробного дыхания к аэробному (Imlay, 2002). Основными источниками гидроксильных радикалов служит взаимодействие пероксида водорода с ионами Fe^{2+}/Cu^{2+} по реакции Фентона и с супероксидным радикалом по реакции Хабера-Вейса (McBee et al., 2017; Valko et al., 2016). Еще одним источником гидроксильных радикалов, менее распространенным у бактерий, является гомолитическое расщепление пероксинитрита ($ONOO^-$), возникающее в результате реакции оксида азота (NO) и O_2^- (Dedon & Tannenbaum, 2004).

Экзогенным источником АФК могут быть некоторые антибиотики. Их влияние на данный процесс зависит от класса антибиотика и механизма действия. Так, фторхинолоны, β -лактамы и аминогликозиды стимулируют активность дыхательных процессов у бактерий, что приводит к увеличению количества АФК (Arabisala & Sabiu, 2022). При воздействии ципрофлоксацина на бактерии *S. aureus* наблюдается высокий уровень перекисного окисления липидов и окисление оснований ДНК. А при гибели бактерий, вызванной действием

ампициллина и канамицина, наблюдается значительное увеличение производства ферментов, участвующих в удалении 8-оксо-2'-дезоксигуанозина, токсического продукта, образующегося под действием АФК (Hong et al., 2019; Zhao & Drlica, 2014). Еще одним источником экзогенных АФК для бактерий, обитающих в воде, может служить пероксид водорода. Он образуется в процессе переноса электронов хромофорами, растворенными в воде, от восстановителей на кислород благодаря возбуждению солнечным излучением (Imlay, 2019).

Основными источниками АФК в эукариотических клетках являются митохондрии (мтАФК) и NADPH-оксидазы. Образование АФК в митохондриях происходит за счет окисления метаболитических интермедиатов электронно-транспортной цепи (ЭТЦ). мтАФК продуцируется в ЭТЦ в форме супероксида, основным источником которого считают комплекс I (Dan Dunn et al., 2015). Цитозольные АФК, возникающие в митохондриях, могут стимулировать дополнительную продукцию АФК посредством активации изоформ протеинкиназы C (PKC) и киназ семейства Src (Nazarewicz et al., 2013).

В пероксисомах производство супероксидного радикала происходит в короткой электронной цепи, связанной с NADH/NADPH-управляемой пероксисомальной мембраной, а также в пероксисомальной матрице, связанной с ксантиноксидоредуктазой (XOD/XDH) и уриказой. Оба этих фермента играют важную роль в катаболизме нуклеиновых кислот и метаболизме уреидов, соответственно (Sandalio & Romero-Puertas, 2015). Пероксид водорода в пероксисомах образуется несколькими путями: при фотодыхании гликолатоксидазой (Foyer et al., 2009); при β -окислении жирных кислот ацил-КоА-оксидазой (Kaur et al., 2009); при дисмутации O_2^- супероксиддисмутазой; при катаболизме полиаминов диаминоксидазой и полиаминоксидазой (Planas-Portell et al., 2013).

В фагоцитах существует несколько сайтов образования АФК. В фагосомах за счет работы NADPH-оксидаз происходит образование супероксид-аниона,

который дисмутирует до пероксида водорода. Именно он используется клеткой для борьбы с патогеном. Синтез АФК также происходит в плазматической мембране и в нефагосомальных внутриклеточных органеллах. Они используются клеткой как сигнальные молекулы (Dupré-Crochet et al., 2013).

В эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) происходят важнейшие процессы модификации и фолдинга белков. При нарушении этих процессов происходит накопление неправильно свернутых и развернутых белков, что приводит к ЭР-стрессу. В результате активации развернутого белкового ответа (UPR) происходит образование АФК, которые, в свою очередь, усиливают ЭР-стресс (Snezhkina et al., 2020).

1.2.3. Антиоксиданты, методы исследования антиоксидантной активности веществ

Тонкий баланс между полезным и вредным воздействием свободных радикалов является важным аспектом метаболизма живых организмов и достигается с помощью комплекса реакций, составляющих систему редокс-регуляции клеточной активности (Valko et al., 2007). Система антиоксидантной защиты клетки включает ряд ферментов и антиоксидантных молекул неферментативной природы. К основным ферментам редокс-системы клетки относятся супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы.

Антиоксиданты неферментативной природы разделяются на природные и синтетические. Основные природные антиоксиданты – это трипептид глутатион, витамины С и Е, β -каротин, коэнзим Q, флавоноиды, танины, антацианы (Fernandez-Panchon et al., 2008; Nimse & Pal, 2015; Rizzo et al., 2010). Наиболее известными синтетическими антиоксидантами являются тролокс, трет-бутилгидрохиноон, пробукол, N-ацетилцистеин, октилгаллат и др. (Barteková et al., 2021; Stoia & Oancea, 2022).

Понятие антиоксидантной активности веществ неоднозначно. С точки зрения химии - это способность веществ нейтрализовать активные радикалы, вызывающие окисление биомолекул, то есть проявлять радикалсвязывающую активность. В биологических системах данное понятие имеет более широкое значение и отражает способность вещества предотвращать окисление биомолекул независимо от механизма действия – это может быть как прямая нейтрализация радикалов и трансформация в менее реакционноспособные формы, так и увеличение активности антиоксидантной системы клетки с участием ферментов (Brainina et al., 2019). Кроме того, к антиоксидантным свойствам вещества также относят его способность связывать ионы металлов, тем самым предотвращая образование гидроксильного радикала в реакции Фентона (Gulcin & Alwasel, 2022).

В зависимости от уровня сложности системы методы оценки антиоксидантной активности можно разделить на химические и биологические. В основе оценки антиоксидантной активности веществ в химических тестах чаще всего лежат реакции связывания радикалов. Выделяют три механизма, по которым может протекать реакция вещества с радикальной частицей: перенос атома водорода (НАТ), перенос одного электрона с последующим переносом протона (SET-PT) и последовательный перенос электронов с потерей протона (SPLET) (Alisi et al., 2020; Gulcin, 2020). Они могут протекать одновременно независимо друг от друга. Первый механизм (НАТ - hydrogen atom transfer) заключается в том, что свободный радикал забирает один из атомов водорода антиоксиданта и сам становится радикалом. Такая реакция зависит от энергии диссоциации связи, не зависит от растворителя и рН и обычно протекают довольно быстро. По второму механизму (SET - single electron transfer) антиоксидант предоставляет свободному радикалу электрон для восстановления. При этом образуется катионный радикал, который подвергается депротонированию. Реакция по этому механизму занимает больше времени и напрямую зависит от рН среды, а длительное время жизни катионного радикала может привести к образованию нежелательных продуктов (Prior et al., 2005). В SPLET (sequential proton loss electron transfer) антиоксидант

отдает протон свободному радикалу и образует анион, который далее отдает электрон, образуя стабильную молекулу (Рис. 1) (Urbaniak et al., 2012; Zeb, 2020). В методах с использованием соединений АВТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) и ААРН (2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид) осуществляется механизм взаимодействия антиоксиданта с радикалом, а DPPH может реагировать с антиоксидантами по любому из трех механизмов (Chen et al., 2020; Liang & Kitts, 2014). Механизм SPLET реализуется, например, в тесте FRAP (ferric reducing antioxidant power) (Chen et al., 2020).

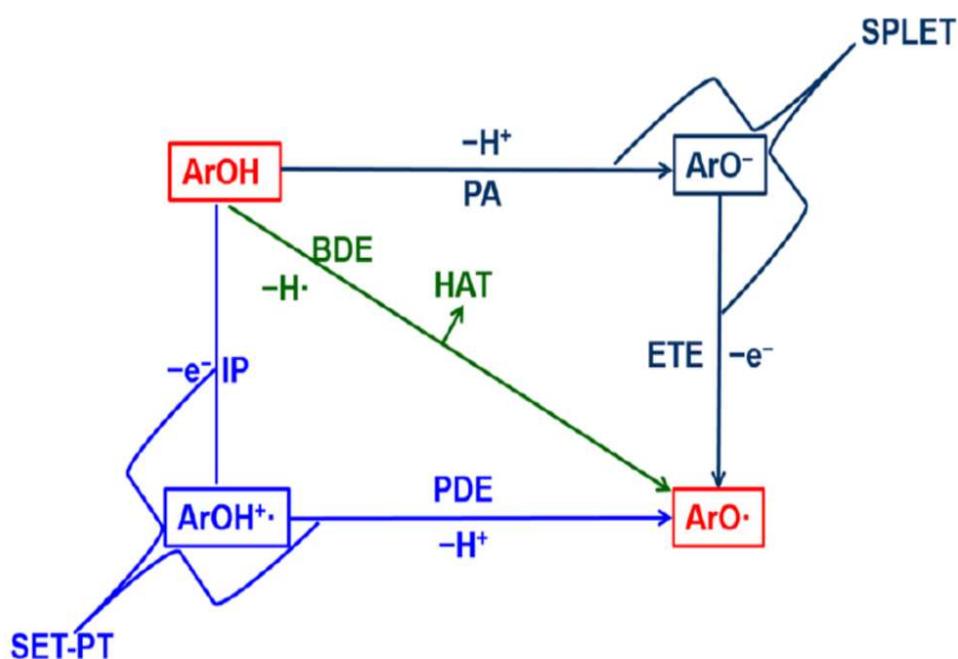


Рисунок 1 – Механизмы антирадикального действия веществ (Zheng et al., 2018).

Химические методы определения антиоксидантной активности веществ можно разделить по методу детекции получаемого сигнала:

1. Фотометрические методы. Уменьшение концентрации радикальных частиц оценивают по изменению оптической плотности раствора (тест с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом - DPPH, FRAP, cupric ion reducing antioxidant capacity - CUPRAC), флуоресценции (oxygen radical absorbance capacity - ORAC) либо хемилюминесценции (методы с использованием люминола) (Xiao et al., 2020).

2. Электрохимические методы основаны на измерении потенциала, тока и электрохимического поведения антиоксиданта, например, во время его взаимодействия с радикальными инициаторами (Pisoschi & Negulescu, 2012).

3. Хроматографические методы связаны с разделением компонентов смеси антиоксидантов и их последующим качественным и количественным анализом (Munteanu & Apetrei, 2021).

Следующим уровнем оценки антиоксидантной активности веществ является определение активности ферментов антиоксидантной защиты клетки в моделях «в пробирке». Для этого могут быть использованы как прокариотические, так и эукариотические объекты. Проводится как оценка влияния вещества на активность отдельных ферментов, так и на суммарную антиоксидантную активность объекта (ТОАС). Модельными объектами могут служить эритроциты крови (Pandey & Rizvi, 2011), клетки печени, яйцеклетки хомяка (Hodder et al., 2000) лабораторные штаммы бактерий (Smirnova et al., 2009). Определяют активность таких ферментов, как каталаза, супероксиддисмутаза, глутатион-S-трансфераза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза (Alam et al., 2013). Также маркерами изменения окислительно-восстановительного статуса клетки являются уровни окисленной и восстановленной форм глутатиона, перекисного окисления липидов и количество окисленных белков (Couto et al., 2016; Wood et al., 2006).

Оценку влияния веществ на антиоксидантную систему всего организма проводят на червях (de Torre et al., 2019), рыбах (Cong et al., 2020), мышах (Hirst et al., 2013) и крысах (Moura et al., 2016). В качестве материала для исследования используют цельную кровь, плазму либо гомогенаты различных тканей. Как и в моделях «в пробирке» определяют общий окислительный статус материала, активность различных ферментов и уровень окисления липидов и белков.

1.3. Методы определения генотоксичности

Генотоксичность химических соединений может быть связана с повреждением ДНК в виде точечных мутаций или хромосомных aberrаций. Для

оценки генотоксичности ксенобиотиков применяется большое количество методов, использующих широкий спектр организмов и типов клеток. Не существует единого теста, который адекватно выявляет генетические повреждения, вызванные всеми химическими классами генотоксичных соединений и/или сложными химическими смесями. В каждом конкретном случае выбор теста или батареи тестов зависит от цели исследования и природы ксенобиотика.

1.3.1. Тест Эймса

Тест Эймса часто используется на первом этапе скрининга генотоксичности исследуемых веществ. Тест разработан в начале 1970х годов (Ames et al., 1973) несколько раз модифицировался и основан на использовании нескольких гистидин-зависимых штаммов бактерий *Salmonella typhimurium*, каждый из которых несет различные мутации в генах гистидинового оперона. Наличие мутации в генах структурных оперонов позволяет проводить положительный отбор ревертантов *his*⁺ на чашках с агаром (Tabrez et al., 2011). Делеция гена *uvrB* у большинства тестовых штаммов приводит к более высокой эффективности мутагенеза за счет инактивации одной из систем репарации ДНК. Штаммы, используемые в тесте Эймса, также несут мутацию *rfa*, которая вызывает частичную потерю липополисахаридного барьера, покрывающего поверхность бактерий, и увеличивает проницаемость для больших и неполярных молекул, которые не проникают через нормальную клеточную стенку. *S. typhimurium* (Ames et al., 1973). Наибольшую вероятность выявления мутагенности тестируемого соединения дает использование нескольких штаммов.

Одним из основных ограничений теста Эймса является использование прокариотических организмов. Многие канцерогенные вещества химически инертны и приобретают генотоксичные свойства в процессе биотрансформации в организме млекопитающих. Для решения данной проблемы используют фракцию S9 печени млекопитающих (Ames et al., 1973).

Вариацией теста Эймса является флуктуационный тест, разработанный Грином и его коллегами (Bridges et al., 1977), и представляющий собой статистический метод обнаружения индуцированных мутаций у бактерий, культивируемым в жидкой среде. В тесте флуктуации используются указанные выше штаммы *S. typhimurium* и фракция S9. Рост *his*⁺ ревертантов в этом случае обнаруживается по изменению цвета индикатора бромкрезоловый пурпурный с синего на желтый, вследствие снижения pH среды. Этот тест также свободен от проблем, связанных с применением агара.

Несмотря на высокую чувствительность, способность к автоматизации, возможность использования гепатоцитов для метаболической активации и его повышенную чувствительность, флуктуационный тест не смог получить такой популярности как тест на чашках (Tabrez et al., 2011).

1.3.2. Тест WP2

В качестве альтернативы тесту Эймса широко используется тест WP2. В его основе лежит использование штамма WP2 бактерий *Escherichia coli* (Oda, 2017). Тест основан на реверсии ауксотрофии по триптофану. Все штаммы WP2 несут одну и ту же пару оснований АТ в критическом сайте мутации в гене *trpE* (Mortelmans & Riccio, 2000). Для оценки генотоксичности, вызванной окислительным повреждением, был разработан штамм IC203, производный от WP2 *uvrA*/pKM101 и дефицитный по функции OxyR. Дефицит OxyR предотвращает индуцированный окислительным стрессом синтез антиоксидантных ферментов, таких как каталаза-пероксидаза, алкилгидропероксидаза и глутатионредуктаза. Для детекции SOS-независимых мутаций, индуцированных образованием 8-оксогуанина, в тест WP2 был добавлен штамм *E. coli* IC206, производный от WP2 *uvrA* и несущий делецию в гене *umuDC*. Эти два штамма полезны как для скрининга мутаций, индуцируемых окислительным стрессом, так и для поиска антиоксидантов, предотвращающих мутагенез (Blanco et al., 1998, 2000).

1.3.3. SOS-хромотест

У бактерий в ответ на повреждение ДНК индуцируется большая группа генов, составляющих так называемый SOS-ответ. Основные активности этих генов связаны с репарацией ДНК и мутагенезом. Одним из генов, включенных в SOS-ответ, является *sfiA*, кодирующий ингибитор деления бактериальных клеток. В варианте SOS-хромотеста, примененном в нашей работе, был использован генно-инженерный штамм *E. coli*, несущий слияние промотора гена *sfiA* со структурным геном β -галактозидазы (*lacZ*) (Quillardet et al., 1982).

Активность β -галактозидазы, образующейся в количестве пропорциональном экспрессии гена *sfiA*, определяют по образованию желтого хромофора о-нитрофенола, образующегося под действием фермента из о-нитрофенил- β -D-галактозида (Griffith & Wolf, 2002). SOS-хромотест сопоставим по точности и чувствительности с такими методами как тест Эймса и применим для скрининга химических соединений на генотоксичность.

1.3.4. Метод ДНК-комет

Метод ДНК-комет, также известный как метод гель-электрофореза единичных клеток, широко применяется для детекции разрывов ДНК. Метод был разработан в 1984 году Остлингом и Йохансоном (Ostling & Johanson, 1984). В первоначальном варианте лизис и электрофорез проводили в нейтральных условиях, а окрашивание - акридиновым оранжевым. Полученное изображение выглядело как «комета» с отчетливой головой, состоящей из неповрежденной ДНК, и хвостом, состоящим из сломанных частей ДНК (Рис. 2). Степень высвобождения ДНК из головы кометы зависела от дозы тестируемых токсикантов (Tabrez et al., 2011). Однако этот метод позволял обнаружить только двухцепочечные разрывы. В дальнейшем метод был модифицирован таким образом, что стало возможным выявление однонитевых разрывов (Singh et al., 1988).

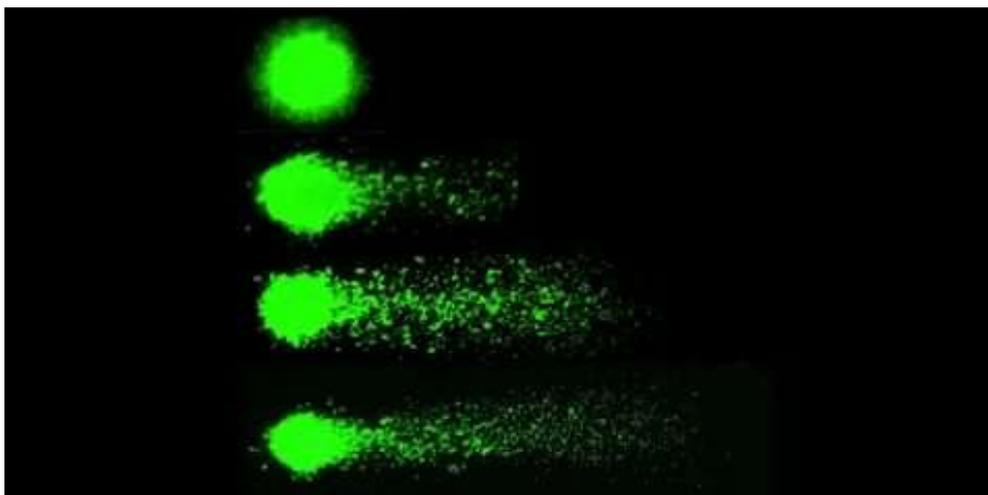


Рисунок 2 – Клетки с разной степенью разрушения ДНК.

Для оценки генотоксичности ксенобиотиков и физических факторов окружающей среды, воздействующих на человека, могут быть использованы линии различных клеток (Kruszewski et al., 2019). В случае с оценкой генотоксичности потенциальных лекарственных средств рациональным представляется использование клеточных линий печени человека (Mišík et al., 2019). Основным недостатком данного метода является трудоемкость подбора условий проведения теста в зависимости от используемых клеток. Также достаточно сложно сопоставлять результаты, полученные в разных лабораториях. Для оценки повреждения ДНК используют методики с модификациями и абсолютно разные показатели (например, процент ДНК в «хвосте кометы» или длину «хвоста»).

1.3.5. Микроядерный тест.

Микроядро образуется, когда хромосома или фрагмент хромосомы не включаются в одно из дочерних ядер во время деления клетки. После телофазы этот хромосомный материал формируется в отдельное округлое тело внутри цитоплазмы, которое отделено от любого из основных ядер и рассматривается как признак генотоксического действия и хромосомной нестабильности (Rodrigues, 2019). Микроядра характерны для раковых клеток и могут указывать на повреждение генома.

Шмид (Schmid, 1975) и Хедль (John A. Heddle, 1973) независимо предложили для оценки повреждения хромосом *in vivo* использовать подсчет количества микроядер, также известных гематологам как тельца Хауэлла – Джолли, в делящейся популяции клеток, такой как костный мозг. На сегодняшний день применяется несколько методов, среди которых широко распространен подсчет микроядер в незрелых эритроцитах крови млекопитающих *in vivo*. Недостатком метода являлась необходимость умерщвления животного. Позже был разработан метод с использованием незрелых эритроцитов периферической крови. При созревании клетки-предшественники эритроцитов теряют свои ядра, однако сохраняют микроядра, образованные на стадии зародышеобразования (OECD, 2016).

1.3.6. *Drosophila melanogaster*

Соматический мутационный и рекомбинационный тест был разработан Графом и соавторами (Graf et al., 1984). В основе метода лежит действие изучаемого агента на геном активно делящихся клеток имагинального диска крыла личинки *Drosophila melanogaster*, гетерозиготной по рецессивным мутациям, маркирующим клетку крыла (Zakharenko & Zakharov, 2016). Для оценки индукции мутаций, вызванных точечными мутациями, делециями или митотической рекомбинацией, в тесте используют рецессивные генетические маркеры *multiple wing hair (mwh)* и *flare-3 (flr)*, локализованные на хромосоме 3 (Marcos et al., 2014). Крыло *D. melanogaster* содержит 24400 клеток, расположенных в два слоя, и в норме каждая клетка крыла имеет одну ворсинку (Zakharenko & Zakharov, 2016). Мутация по гену *mwh* приводит к образованию нескольких ворсинок разной длины на одной клетке, а мутация в гене *flr* к изменению формы ворсинки.

Следует отметить, что самым специфичным и дорогим методом оценки генотоксичности веществ является использование генно-инженерных линий мышей. Так, линия *Cyp2e1^{-/-}* позволяет оценить генотоксичность и цитотоксичность веществ, метаболизирующихся через CYP2E1 (Ghanayem &

Hoffler, 2007). Мыши ApoE^{-/-} (мышь с нокаутом аполипопротеина E, ApoE^{-/-}) могут служить хорошей моделью для оценки генотоксичности веществ, которые потенциально будут применяться для терапии пациентов с повышенным уровнем холестерина (Jacobsen et al., 2009).

1.4. Микробиом желудочно-кишечного тракта

1.4.1. Состав, функции

Микробиом кишечника человека представляет собой совокупность обитающих в нем бактерий, архей, грибов и вирусов, самыми многочисленными из которых являются бактерии (Marchesi & Ravel, 2015). Благодаря развитию методов секвенирования удалось оценить долю различных микроорганизмов, в том числе, ранее неизвестных (Nayfach et al., 2019; W. L. Wang et al., 2015). Установлено, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека является местом обитания для представителей примерно 150 родов (Morgan et al., 2013). Основные представители бактерий относятся к филумам *Bacteroidetes* (в основном, к родам *Bacteroides* и *Prevotella*) и *Firmicutes* (в основном, к родам *Clostridium* и *Lactobacillus*) (Ghosh & Pramanik, 2021; Shreiner et al., 2015). Большинство из них являются строгими анаэробами (97 %): *Firmicutes* - 64 %, *Bacteroidetes* - 23 %, *Proteobacteria* - 8 % и *Actinobacteria* - 3 % (Рис. 3). Также встречается небольшое количество представителей *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* и TM7 (2%). Грибы и археи составляют менее 1% от общей кишечной микробиоты (JRC F7, 2018; The Human Microbiome Project Consortium et al., 2012).

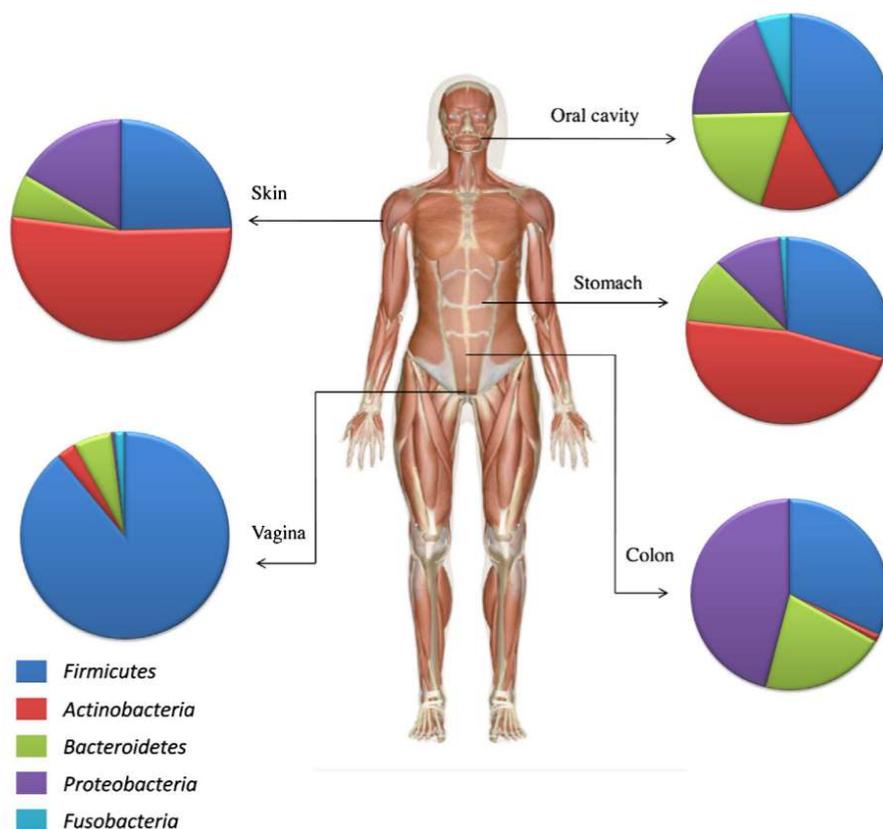


Рисунок 3 – Вклад представителей различных бактериальных таксонов в микробимные сообщества организма человека (Sankar et al., 2015).

Бактерии играют важную роль в функционировании организма человека (Heintz-Buschart & Wilmes, 2018; Matthewman et al., 2023), защищая нас от патогенных микроорганизмов путем синтеза антибактериальных веществ (Gieryńska et al., 2022; Parker et al., 2020), а также от ксенобиотиков, трансформируя их в безопасную форму (Collins & Patterson, 2020; Sun & Chang, 2014).

Способность синтезировать витамины (B5, B9, B12 и K) и необходимые жирные кислоты (например, линолевую кислоту) делает бактерии важными для человека симбионтами (Devillard et al., 2007; Rowland et al., 2018). Благодаря собственному метаболизму бактерии способны влиять на формирование иммунитета через регуляцию уровня Т-лимфоцитов в ЖКТ и индукцию синтеза интерлейкинов (IL-17, IL-22) и противовоспалительных цитокинов, а вырабатываемый ими АТФ способен индуцировать дифференцировку клеток

слизистой оболочки кишечника (Gieryńska et al., 2022; Kho & Lal, 2018). Также они способны взаимодействовать с толл-подобными рецепторами, которые передают сигнал для поддержания гомеостаза кишечного иммунитета (Yiu et al., 2017). Микроорганизмы могут служить микробными эндокринными медиаторами и реагируют на раздражители, продуцируя нейрохимические вещества, влияющие на двунаправленную систему связи между центральной нервной системой и желудочно-кишечным трактом (мозг-кишечник-микробиом) своего хозяина (Xu et al., 2020). Влияние на нервную систему может осуществляться, например, за счет изменения биодоступности катехоламинов. Несколько соединений, включая короткоцепочечные жирные кислоты бактерий (пропионовую и масляную), активируют рецепторы в нейронах, регулирующих моторику кишечника (Cryan et al., 2019; Dempsey et al., 2019). Кроме того, влияние на ЦНС может происходить опосредованно через энтеральную нервную систему: микробиом способен участвовать в модулировании нейроактивных стероидных сигналов, передающих информацию по оси кишечник-мозг (Santos-Marcos et al., 2020; So & Savidge, 2022).

Изменения в биоразнообразии микробиома ЖКТ связаны с целым рядом заболеваний, затрагивающих ЦНС, эндокринную систему, иммунную систему и различные виды рака (Gholizadeh et al., 2019; Pflughoeft & Versalovic, 2012). Еще на этапе формирования микробиоты у новорожденных нарушение передачи бактерий от матери ребенку при кесаревом сечении может увеличить риск развития целиакии, астмы, диабета 1 типа и ожирения (Mueller et al., 2015). Различия в микробном составе могут влиять на обмен веществ в организме и накопление энергии, а также на предрасположенность к ожирению (Zsálig et al., 2023). Измененный микробный состав кишечника при ожирении связан с избытком энергии, извлекаемой из неперевариваемых пищевых углеводов, повышением проницаемости кишечника и выработки провоспалительных метаболитов, таких как липополисахариды, что приводит к системному воспалению и резистентности к инсулину (Sankararaman et al., 2023).

Участие бактерий кишечника в образовании иммунного ответа вносит свой

вклад в течение различных аутоимунных заболеваний, таких как целиакия (Galvis et al., 2021), системная красная волчанка (Xiang et al., 2021), ревматоидный артрит, рассеянный склероз (Miyake et al., 2015). Так, антитела к *Saccharomyces cerevisiae*, комменсальным дрожжам, являются биомаркером болезни Крона (De Luca & Shoenfeld, 2019). Развитие аллергических реакций также коррелирует с дисбактериозом кишечника. В исследовании (De Filippis et al., 2021) было показано, что метагеном детей-аллергиков, обладающих провоспалительным потенциалом, обогащен генами, участвующими в производстве бактериальных липополисахаридов и уреазы. Увеличить риск развития у новорождённого аллергий различного генеза может изменение в микробиоме матери во время беременности (Gao et al., 2021)

Различные виды неврологических заболеваний (Parker et al., 2020), включая болезнь Альцгеймера (БА) (Chandra et al., 2023) и болезнь Паркинсона (БП) (Wallen et al., 2022), расстройства аутистического спектра (West et al., 2022), синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) (Stiernborg et al., 2023), нервную анорексию (Dhopatkar et al., 2023), депрессию (Donoso et al., 2023), шизофрению (Tsamakis et al., 2022) и биполярные расстройства (Sublette et al., 2021), также связаны с изменениями микробиомного состава. Бактерии кишечника могут влиять на течение данных заболеваний посредством 1) прямой биотрансформации ксенобиотиков в нейрореактивные или неактивные метаболиты; 2) изменения эндогенных микробных нейрореактивных метаболитов, некоторые из которых могут обладать потенциалом эпигенетического перепрограммирования регуляции транскрипции генов-хозяев, участвующих в когнитивных функциях в головном мозге; 3) модулирования нейровоспаления путем воздействия на целостность кишечного барьера и системную доступность кишечных провоспалительных цитокинов; и 4) регуляции иммунной функции слизистой оболочки ЖКТ (Dempsey et al., 2019; Pearson-Leary et al., 2020).

Последние двадцать лет основной причиной смертности людей являются сердечно-сосудистые заболевания. Микробиота кишечника может напрямую

влиять на гиперхолестеринемию и развитие ишемической болезни сердца посредством продукции метаболитов, таких как желчные кислоты, копростанол, короткоцепочечные жирные кислоты и продукция N-оксид триметиламина (Kazemian et al., 2020; Peng et al., 2018). N-оксид триметиламина и фенилацетилглутамин являются метаболитами, зависящими от кишечной микробиоты, уровни которых в крови связаны с возникновением риска сердечно-сосудистых заболеваний, что было показано в крупномасштабных клинических исследованиях (Witkowski et al., 2020).

1.4.2. Взаимодействие с лекарствами

Данные о возможном влиянии представителей микробиома кишечника на свойства лекарственных средств накапливались в течение всего 20 века. В 1937 году была опубликована статья об активации антибактериального препарата «пронтозил» бактериями кишечника (Fuller A, 1937). К настоящему времени, благодаря развитию технологий полногеномного секвенирования, были обнаружены новые представители микробиома, которые не удавалось выделить культивированием в лабораторных условиях. Также стали возможны сравнительные исследования микробиомов людей с различными заболеваниями (Schupack et al., 2022).

Лекарственные вещества и микробное сообщество кишечника могут взаимодействовать различными путями. Так, биологически активное соединение может обладать бактерицидным, либо бактериостатическим действием в отношении отдельных представителей микробиома. Наиболее ярким примером такого влияния является дисбиоз в результате приема антибиотиков различных классов (Ferrer et al., 2017; Mu & Zhu, 2019). Использование методов культуромики и секвенирования следующего поколения позволило продемонстрировать, что постантибиотический дисбиоз, помимо снижения количества бактерий и микробиологического разнообразия, вызывает снижение устойчивости микробиома к вторгающимся патогенам (Becattini et al., 2016; Hill et al., 2010). При

этом, наблюдаемые изменения отличаются для представителей разных классов (Kim, 2015). Изменения в микробном составе могут отличаться даже при действии двух веществ одного класса. Так, введение ципрофлоксацина и моксисилина лабораторным крысам вызывало изменение соотношения *Firmicutes* к *Bacteroidetes* при введении первого, но не второго антибиотика (Wang et al., 2022). Кроме того, влияние антибиотика зависит от пути введения, концентрации, времени экспозиции и индивидуального состава микробиома пациента (Konstantinidis et al., 2020).

Но не только антибактериальные препараты могут приводить к изменению микробиомного состава (Vich Vila et al., 2020). Было установлено, что 24% из 1079 лекарственных средств, относящихся к различным биологически активным группам, способно подавлять рост хотя бы одного из 40 видов бактерий, представителей микробиома кишечника человека (Maier et al., 2018), тем самым изменяя таксономический баланс. Например, использование лекарств – ингибиторов протонной помпы – может привести к снижению колонизационной устойчивости и развитию кишечной инфекции, вызванной такими бактериями, как *Clostridium difficile*, *Campylobacter* и *Salmonella* (Jackson et al., 2016; Weersma et al., 2020).

Кроме того, лекарственные препараты могут приводить к перемещению микробиома из определенных участков тела в кишечник, снижая кислотный барьер желудка, что позволяет микробам полости рта проходить через желудок в кишечник, вызывая микробный дисбиоз (Weersma et al., 2020).

С другой стороны, биотрансформация лекарственных препаратов с участием микроорганизмов ЖКТ может влиять на их свойства. Примером положительной биотрансформации могут служить азо-содержащие противовоспалительные препараты (сульфасалазин и др.), когда под действием микроорганизмов происходит превращение неактивных предшественников (пролекарств) в активные субстанции (Koppel et al., 2017). К отрицательной биотрансформации можно отнести случай с увеличением токсичности препаратов (нитразепама и

кетопрофена) или инактивации (дигоксина) при действии бактериальных ферментов (Clarke et al., 2019; Enright et al., 2016). Лекарственные препараты могут метаболизироваться с участием таких ферментов, продуцируемых микробов, как β -глюкуронидазы, нитроредуктазы и сульфоксидредуктазы (Strong et al., 1987). Основные механизмы биотрансформации лекарственных веществ бактериями кишечника могут быть классифицированы следующим образом:

1. Гидролиз. Некоторые лекарственные вещества могут подвергаться гидролизу бактериальными энзимами в кишечнике, например, индометацин и кетопрофен (Saitta et al., 2014).

2. Окисление. Бактерии могут окислять лекарственные вещества с помощью таких ферментов как цитохром P450 (Dempsey & Cui, 2019). Так как окисление является первой фазой трансформации ксенобиотиков ферментами печени, сложно отследить какой из механизмов вовлечен в метаболизм конкретной молекулы.

3. Редукция. Кишечные бактерии могут восстанавливать широкий спектр функциональных групп, в том числе алкенизанды, производные ν -ненасыщенной карбоновой кислоты, нитро-, N-оксидные, азо- и сульфоксидные группы. Примером негативной редукции может служить инактивация кардиопрепарата дигоксин бактериями *Eggerthella lenta* (Haiser et al., 2013). Примером позитивной азоредукции является образование 5-аминосалициловой кислоты из пролекарства сульфасалазина (Clarke et al., 2019).

4. Присоединение функциональных групп. Ферменты трансферазы перемещают функциональные группы между двумя субстратами посредством реакций нуклеофильного замещения (метилирование, ацилирование, гидроксिलирование) (Koppel et al., 2017). Примером такой трансформации является N-ацетилирование противовоспалительного соединения 5-аминосалициловой кислоты микробными N-ацетилтрансферазами, в результате чего образуется терапевтически неактивный метаболит (Deloménie et al., 2001).

5. Отделение функциональных групп (деметилование, дезаминирование, декарбоксилирование, деалкилирование). Микробное О-деалкилирование является частью метаболизма ингибитора тирозинкиназы селезенки фостаматиниба. Декарбоксилирование ферментами бактерий происходит при применении препарата леводопа (Wilson & Nicholson, 2017).

6. Конъюгация. Конъюгация лекарственных молекул может происходить с малыми молекулами, такими как глюкоронид и глутатион. Примером может служить конъюгация диазепама с глюкоронидом (Dinis-Oliveira, 2017).

Необходимо отметить, что механизмы биотрансформации лекарственных веществ в кишечнике не являются универсальными и могут варьироваться в зависимости от многих факторов, включая состав микрофлоры кишечника и физиологические особенности индивидуальных пациентов.

1.5. *Escherichia coli*

1.5.1. Роль в микробиоме человека

Бактерия *Escherichia coli* является грамм-отрицательной палочковидной бактерией, основным местом обитания которой является желудочно-кишечный тракт теплокровных организмов. В кишечнике человека она обнаруживается более чем в 90% случаев (Tenaillon et al., 2010) и составляет около 0,1 % микробиома (Gao et al., 2014). Штаммы *E. coli* в кишечнике человека имеют несколько генотипов, некоторые из них могут быть патогенами. Известно, что *E. coli* является причиной инфицирования нескольких миллионов человек ежегодно (White et al., 2011), вызывая инфекции желудочно-кишечного тракта и мочевыводящих путей, а также может стать причиной менингита (Kaper et al., 2004). При этом, изменения в соотношении непатогенных штаммов *E. coli* коррелируют с процессами воспаления ЖКТ, диабетом и ожирением (Gao et al., 2014).

В процессе колонизации высокая кислотоустойчивость обеспечивает *E. coli* высокую трансмиссивность, позволяющую заселять ЖКТ всего лишь десятью

бактериальными клетками (Foster, 2004). Достигнув толстой кишки, бактерии находят питательные вещества, необходимые для перехода от лаг-фазы к логарифмической фазе роста. Нерастущие клетки элиминируются (Freter et al., 1983). Успешная колонизация толстой кишки зависит от конкуренции за питательные вещества с комменсальной микробиотой, проникновения через слой слизи и способности противостоять защитным механизмам хозяина (Conway & Cohen, 2015). В пищеварительном тракте бактерии *E. coli* локализуются в основном в слепой и толстой кишке. Они погружены в слизистый слой, покрывающий эпителиальные клетки по всему тракту, и выделяются в просвет кишечника вместе с деградировавшим компонентом слизи. Слизь составляет пищевую экологическую нишу, к которой приспособился метаболизм *E. coli* (Tenaillon et al., 2010).

E. coli, являясь одним из основных факультативных анаэробов ЖКТ, способна поглощать кислород вдоль внутренней поверхности желудочно-кишечного тракта, позволяя активно развиваться облигатным анаэробам (Mueller et al., 2015). Как непатогенные, так и патогенные штаммы *E. coli* вносят вклад в образование биопленок совместно с другими бактериями микробиома (Beloin et al., 2008; Flament-Simon et al., 2019). Также, *E. coli* могут быть источником менахинона для ряда бактерий, эволюционно утративших возможность его синтезировать (Fenn et al., 2017). Непатогенное сообщество *E. coli*, обитающее в организме человека, может играть роль в колонизации желудочно-кишечного тракта патогенами и быть резервуаром для генов вирулентности и устойчивости к антибиотикам (Richter et al., 2018).

1.5.2. Антиоксидантная система *E. coli*

В ходе эволюции бактерии, как и другие организмы, создали защитные механизмы от различных типов окислительного стресса (Смирнова Г.В. & Октябрьский О. Н., 2005).

Как указано выше, основными источниками активных радикалов у *E. coli* являются элементы дыхательной цепи. Супероксидный анион образуется в процессе работы цитохромов, а его инактивация происходит при дисмутации до пероксида водорода (McVee et al., 2017). В образовании $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 также участвуют такие ферменты, как НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа и D-лактатдегидрогеназа (Messner & Imlay, 1999). Образование гидроксильного радикала происходит при взаимодействии пероксида водорода с двухвалентным железом в реакции Фентона (Cabiscol et al., 2000).

Регуляция уровня активных форм кислорода происходит благодаря балансу между их образованием и утилизацией. У *E. coli* система ферментативной защиты от окислительного стресса находится под контролем регулонов OxyR и SoxRS. OxyR включает каталазу-гидропероксидазу I, кодируемую геном *katG*, НАДФН-зависимую алкилгидропероксидазу, кодируемую *ahpFC*, глутатионредуктазу, кодируемую *gorA*, защитный ДНК-связывающий белок, кодируемый *dps*, и несколько других генов (Gonzalez-Flecha & Demple, 1995). Под контролем SoxRS находится продукция Mn-супероксиддисмутазы, кодируемой геном *sodA*, эндонуклеазы IV, кодируемой *nfo*, фумаразы C, кодируемой *fumC*, и ряд других продуктов (Demple, 1996).

Основными ферментами защиты от окислительного стресса являются супероксиддисмутазы (SOD), каталазы и пероксидазы. *E. coli* имеет 3 различных SOD, кодируемых генами *sodA*, *sodB* и *sodC*, которые участвуют в метаболизме $O_2^{\cdot-}$. *sodA* кодирует индуцибельную цитозольную Mn-SOD; *sodB* - Fe-SOD, которая конститутивно синтезируется в клетке на базовом уровне при нормальном метаболическом процессе; *sodC* – кодирует периплазматическую Cu-Zn-SOD, которая отвечает за деструкцию периплазматического и внеклеточного $O_2^{\cdot-}$. Продуктом дисмутации $O_2^{\cdot-}$ является H_2O_2 . *E. coli* имеет 2 каталазы – гидропероксидазу HPI и HPII, вовлеченные в детоксикацию H_2O_2 . HPI кодируется геном *katG*, который транскрипционно контролируется на различных уровнях и отвечает за деструкцию экстраклеточного пероксида во время аэробного роста.

НРП кодируется геном *katE*, который индуцируется в стационарной фазе. Кроме этих ферментов, алкилгидропероксидредуктаза (*ahpCF*) обеспечивает дополнительный механизм обезвреживания низких концентраций внутриклеточного пероксида (Ighodaro & Akinloye, 2018; Lei et al., 2015). Кроме того, накапливаются данные о вкладе в процесс регуляции уровня АФК терминальных оксидаз. Эти ферменты катализируют четырехэлектронное восстановление O_2 до $2H_2O$ с использованием хинола или цитохрома в качестве донора электронов чем связывают каталитическую окислительно-восстановительную реакцию с генерацией протонной движущей силы. Так, кроме снижения общего уровня кислорода, оксидаза цитохром *bd-I* способна оттягивать электроны от фумаратредуктазы, продуцирующей АФК, что приводит к уменьшению количества АФК. Цитохром *bd-I* и цитохром *bd-II* способны напрямую метаболизировать H_2O_2 посредством каталазного механизма (Borisov et al., 2021).

Основным неферментативным элементом антиоксидантной защиты является трипептид глутатион (GSH), состоящий из глицина, глутамата и цистеина (Carmel-harel & Storz, 2000). В своей восстановленной форме GSH способен инактивировать АФК, хотя и с намного меньшей эффективностью, чем каталазы. Как и многие цистеинсодержащие молекулы, глутатион может окисляться, при этом между двумя молекулами глутатиона образуется дисульфидный мостик с образованием окисленного димера (GSSG). Образование димера происходит, когда АФК отдают один электрон молекуле GSH. Восстановление окисленного глутатиона происходит с помощью фермента глутатионредуктазы. У эукариот другой фермент системы глутатиона - глутатионпероксидаза - участвует в нейтрализации пероксида водорода, используя две молекулы глутатиона в качестве акцепторов. Система глутатиона действует как основной окислительно-восстановительный буфер в большинстве клеток (Couto et al., 2016; Октябрьский et al., 2007).

В эукариотических организмах глутатион играет ключевую роль в защите от окислительного стресса, являясь кофактором селенозависимых и независимых

глутатионпероксидаз. При окислительном стрессе происходит интенсивное окисление GSH, в результате чего снижается соотношение GSH/GSSG. Это является одним из основных признаков окислительного стресса в эукариотических клетках. В отличие от эукариот, *E. coli*, как и другие бактерии, не содержат глутатионпероксидаз, и поэтому изменения в статусе глутатиона и его роль при ответе на окислительный стресс у эукариот и бактерий существенно различаются (Carmel-harel & Storz, 2000; Meister & Anderson, 1983). Так, у *E. coli* только летальные дозы H_2O_2 вызывают значительное повышение внутриклеточного GSSG и снижение соотношения GSH/GSSG (Greenberg & Demple, 1986; Smirnova et al., 2000). Отмечено также, что в экспоненциальной фазе роста мутанты *E. coli*, дефицитные по синтезу глутатиона и растущие на среде с аминокислотами, не проявляют повышенной чувствительности к действию H_2O_2 (Greenberg & Demple, 1986). Недавно было показано, что *gsh* мутанты *E. coli*, растущие на минимальной среде, намного чувствительнее к пероксидному стрессу, чем клетки родительского типа (Smirnova et al., 2019).

1.5.3. Дыхательная система *E. coli*

Бактерии *E. coli*, являясь факультативными анаэробами, способны расти при различном содержании кислорода в среде. В случае аэробного роста кислород служит конечным акцептором электронов в электрон-транспортной или дыхательной цепи (ЭТЦ). При этом происходит последовательный перенос электронов от доноров к акцепторам при перемещении протонов из цитоплазмы через мембрану. Образующийся протонный градиент используется для синтеза АТФ, а также для транспорта веществ через мембрану и движения жгутиков (Henkel et al., 2014).

Основные компоненты ЭТЦ и их функции: дегидрогеназы окисляют цитоплазматические доноры электронов, такие как NADH и FADH, путем восстановления связанных с мембраной хинонов до хинолов. Терминальные

оксидазы окисляют хиноны, используя кислород в качестве внешнего акцептора электронов (Рис. 4) (Bettenbrock et al., 2014).

При росте с кислородом в качестве единственного акцептора электронов наиболее важными ферментами являются НАДН-дегидрогеназа I (Nuo) и II (Ndh), сукцинатдегидрогеназа (Sdh) и фумаратредуктаза (Frd), а также терминальные оксидазы цитохром bd-I, цитохром bd-II и цитохром bo. Большинство этих ферментов различаются количеством перемещаемых протонов, кинетическими параметрами и диапазоном активности в пределах шкалы аэробноза. Это позволяет бактериям адаптироваться к росту в среде с разным содержанием кислорода (Henkel et al., 2014).

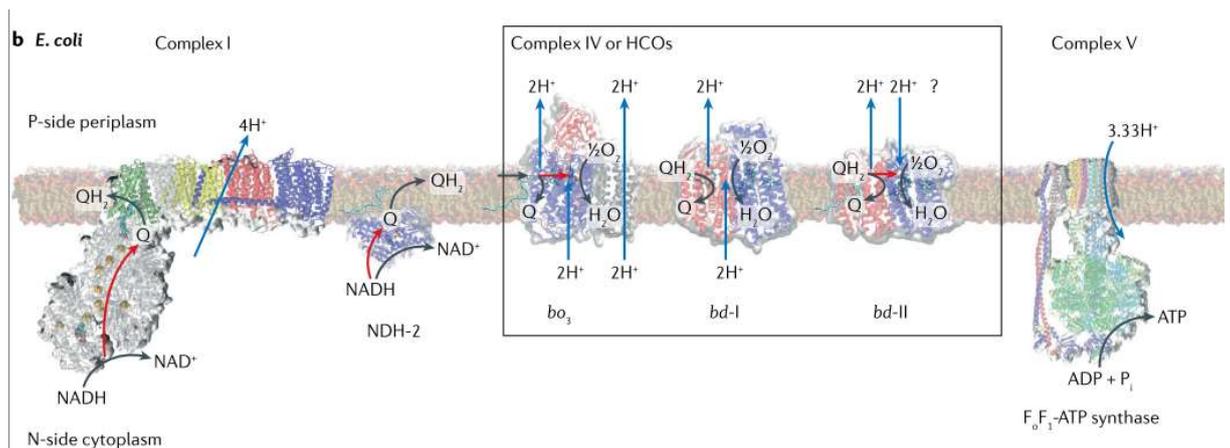


Рисунок 4 – Схема дыхательной цепи бактерий *E. coli* (Kaila & Wikström, 2021).

В условиях анаэробного роста акцепторами электронов могут выступать нитраты, нитриты и диметилсульфоксид (Kaila & Wikström, 2021).

Хиноны *E. coli* представлены тремя типами: убихинон, деметилменахинон и менахинон. Убихинон в основном используется при аэробном дыхании и нитритном дыхании. Менахинон является основным хиноном в анаэробных условиях. Было установлено, что при увеличении кислорода в среде общий уровень убихинонов увеличивается, а менахинонов снижается (van Beilen & Hellingwerf,

2016). Деметилменахинон может быть вовлечен в передачу электронов в обоих случаях (Sharma et al., 2012).

Синтез АТФ из АДФ и органического фосфата осуществляется ферментом АТФ-синтазой. Этот фермент использует электрохимическую энергию, запасенную в протонном градиенте, для образования высокоэнергетической фосфатной связи АТФ. АТФ-синтаза состоит из двух блоков – F1 и F0 и 8 различных типов субъединиц $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{10}$ (Рис. 5) (Nakanishi-Matsui et al., 2016; Sobti et al., 2016).

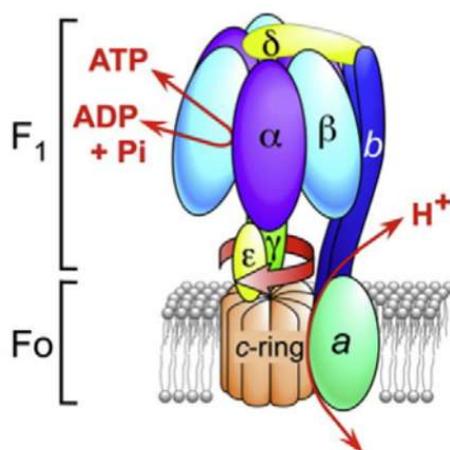


Рисунок 5 – Схема строения фермента АТФ-синтазы (Nakanishi-Matsui et al., 2016).

Блок F1 расположен над мембраной и выполняет каталитическую функцию, которая обеспечивается гексамером из 3 субъединиц α и 3 субъединиц β ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$), в центре которого расположена субъединица γ . Субъединица β может принимать открытую и закрытую формы, связываясь с АТФ и АДФ. Субъединицы b_2 и δ соединяют каталитическую часть фермента с субъединицей a и образуют статор АТФ-азы. Блок F0, образующий ротор фермента, полностью погружен в мембрану и включает в себя кольцо из 10-15 с-субъединиц, а также a и 2 b субъединицы (Vik & Ishmukhametov, 2005). Субъединица ϵ выполняет функцию ингибитора гидролиза АТФ блоком F1.

В процессе синтеза новых молекул АТФ АТФ-синтазой происходит вращение субкомплекса ротора за счет прохождения протонов. При этом протекают конформационные изменения в каталитической области субъединиц β блока F1 с образованием АТФ, в то время как субкомплекс периферического стебля удерживает область F1 неподвижной относительно вращающегося ротора во время катализа (Gao et al., 2005; Guo et al., 2019).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы химические соединения, синтезированные в научно-образовательном центре прикладных химических и биологических исследований ПНИПУ.

Исследование биологической активности проводилось с использованием бактериальных штаммов *Escherichia coli* (табл. 1).

Таблица 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-1</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 М. Volkert) в штамм BW25113 посредством трансдукции фагом P1. Штамм NM3021 (*katG::lacZ*) был создан путем трансформации BW25113 плазмидой pKT1033.

2.2. Условия культивирования

Бактерии *E. coli* выращивали аэробно на минимальной среде М9 (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. После центрифугирования клетки из ночной культуры ресуспендировали в 50 мл свежей среды до значения оптической плотности при 600 нм $\text{OD}_{600} = 0.05-0.07$ и далее выращивали при 37°C в колбах объемом 250 мл на качалках (ИБП РАН, Пущино) при частоте вращения 150 об/мин. За ростом бактерий следили по изменению OD_{600} , измеряемому на фотометре КФК-2 (толщина кюветы 5 мм). Далее пересев проводили либо в 96-луночные планшеты, либо в колбы на 50/250 мл в зависимости от исследуемых параметров.

2.3. Определение радикалсвязывающей активности (РСА)

2.3.1. РСА с ААРН

В основе метода Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) лежит способность радикала ААРН•, который образуется из 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида при 37°C, разрушать молекулу флуоресцеина. При нагревании азид разлагается, выделяя газообразный азот и оставляя после себя два R•. В присутствии кислорода R• почти мгновенно превращаются в реакционноспособные пероксильные радикалы $\text{ROO}\bullet$, которые могут либо атаковать молекулы-мишени (флуоресцеин), либо реагировать с антиоксидантами. При разрушении флуоресцеина радикалом наблюдается снижение уровня флуоресценции. Вещество, обладающее радикалсвязывающей активностью, способно конкурентно связывать свободный радикал, защищая молекулу флуоресцеина от разрушения. При этом наблюдается сдвиг по времени снижения флуоресценции флуоресцеина (Ou et al., 2001). Оценку РСА проводили по следующей методике: в лунку 96-луночного планшета вносили 15 мкл

фосфатно-солевого буфера (PBS), 120 мкл рабочего раствора флуоресцеина (итоговая концентрация 46,7 нМ), растворенного в PBS, и 5 мкл исследуемого вещества, растворенного в ДМСО. Контролем служила проба с 5 мкл ДМСО. Планшет преинкубировали 15 минут при 37° С. Затем многоканальной пипеткой вносили 60 мкл раствора ААРН в PBS (итоговая концентрация 40 мМ). Считывали флуоресценцию каждую минуту в течение 120 минут. Длина волны возбуждения – 485 нм, эмиссии – 520 нм.

Каждое значение кривой пересчитывали по отношению к первому значению:

$$N_t = \frac{n_t}{n_0} \times 100,$$

где n_t – значение флуоресценции в момент времени t ; n_0 – значение флуоресценции в нулевой момент времени.

Площадь под кривой (AUC) рассчитывали как сумму площадей, заключенных между двумя соседними точками, рассчитанных по формуле для расчета площади трапеции.

Степень радикалсвязывающей активности выражали по формуле:

$$PCA, \% = \frac{AUC_{\Pi} - AUC_{AAPH}}{AUC_{\PhiЛ} - AUC_{AAPH}} \times 100,$$

где AUC_{Π} – площадь под кривой с исследуемым веществом, AUC_{AAPH} - площадь под кривой с растворителем, $AUC_{\PhiЛ}$ - площадь под кривой с флуоресцеином без ААРН.

2.3.2. PCA с DPPH

Определение проводили в реакционной смеси, содержащей 3 мл 0.3 мМ этанольного раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (DPPH), 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 7.4) и 20-200 мкл сток-раствора вещества в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Marinova & Batchvarov, 2011). Контролем служила проба с эквивалентным количеством ДМСО. После 30 минут инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение при 517 нм на спектрофотометре Bio-Rad

SmartSpec Plus. Ингибирующий эффект (ИЭ) на уровень DPPH рассчитывали согласно формуле:

$$ИЭ, \% = \frac{OD_{517K} - OD_{517U}}{OD_{517U}} \times 100 ,$$

где OD_{517K} – оптическая плотность контрольной пробы при длине волны 517 нм; OD_{517U} – оптическая плотность исследуемой пробы при длине волны 517 нм.

2.4. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК)

МИК определяли в 96-луночных планшетах методом серийных разведений на минимальной среде М9 с добавлением 0.15% глюкозы. В лунки планшета вносили 190 мкл среды, 5 мкл исследуемых веществ, растворенных в ДМСО, с последовательными двукратными разведениями и по 5 мкл суспензии клеток с $OD_{600} = 0.3$ до общего объема в лунке 200 мкл. 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.

2.5. Определение удельной скорости роста

Удельную скорость роста культуры определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln OD_{t_2} - \ln OD_{t_1}}{t_2 - t_1} ,$$

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.

2.6. Определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ)

Для исследований влияния веществ на КОЕ образцы контрольной культуры и культуры, подвергшейся воздействию вещества, 10-кратно разводили в 0,9%

NaCl в отдельных микропланшетах. Затем по 10 мкл суспензии (по 3 капли каждого разведения, дающего 5–50 колоний) переносили на чашки с LB-агаром. Колонии подсчитывали через 24 ч инкубации при 37°C.

2.7. Определение активности β-галактозидазы

Определение активности β-галактозидазы в клетках штамма *E. coli*, несущих слияния гена *lacZ* с промоторами исследуемых генов, проводили по методу Миллера (Miller, 1972). Для этого отобранные до и после окислительного стресса суспензии клеток (0,5 мл) вносили в 1,5 мл восстановительного буфера, содержащего 0,1 М Na-фосфатный буфер (pH 7), 10 мМ KCl, 1 мМ MgSO₄, 0,1 мМ MnSO₄ · 5 H₂O, 50 мМ меркаптоэтанола и 50 мкг/мл хлорамфеникола. В реакционную смесь добавляли каплю толуола, каплю дезоксихолата, встряхивали и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Затем добавляли 0,5 мл 13,3 мМ раствора *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозида (ОНФГ). Через 8 мин реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1N K₂CO₃. Поглощение измеряли при длине волны 420 нм, что соответствует суммарному поглощению окрашенного продукта *o*-нитрофенола и рассеянию света обломками клеток, и при 550 нм, когда присутствует только рассеяние света обломками клеток, на фотоэлектрокалориметре КФК-2. Используя коэффициент рассеяния света, равный 1,75×OD₅₅₀, вычисляли истинное поглощение *o*-нитрофенола. Активность β-галактозидазы выражали в относительных единицах Миллера и рассчитывали по формуле:

$$A = 1000 \times (OD_{420} - 1,75 \times OD_{550}) / t \times V \times OD_{600},$$

где OD₄₂₀ и OD₅₅₀ – измеренные значения для реакционной смеси; OD₆₀₀ – плотность клеточной суспензии перед определением, измеренная при длине волны 600 нм; t – время реакции в минутах; V – объем культуры, взятой для определения в мл.

При оценке активности β -галактозидазы в культуре, выращенной в иммунологических планшетах была использована модифицированная методика. 30 мкл культуры из каждой ячейки первого планшета, где осуществляли выращивание и обработку культуры исследуемыми веществами, переносили во второй планшет с 90 мкл восстановительного буфера, 50 мМ меркаптоэтанола и 50 мкг/мл хлорамфеникола. Затем добавляли по 1 мкл дезоксихолата натрия и толуола и инкубировали 30 мин при температуре 37°C и 150 об/мин. После чего добавляли 30 мкл 13,3 мМ ОНФГ, инкубировали 1 час и останавливали реакцию добавлением 30 мкл 1N K₂CO₃. Каждое измерение дублировали контролем без ОНФГ (вместо которого добавляли 30 мкл восстановительного буфера). Поглощение измеряли при длинах волн 420 нм и 550 нм. Расчет активности фермента проводили как описано ранее.

2.8. Определение биопленкообразования

Образование биопленок оценивали с помощью метода, основанного на их способности окрашиваться красителем кристаллическим фиолетовым. После центрифугирования ночной культуры клетки ресуспендировали в свежей среде М9 до исходной OD₆₀₀ = 0.1. Суспензию культуры вносили в 96-луночные планшеты (по 5 мкл на лунку), содержащие 5 мкл исследуемого вещества, растворенного в ДМСО и 190 мкл среды М9 с добавлением глюкозы. Для получения биопленок планшеты инкубировали без перемешивания при 37°C в течение 22 ч. Контрольные лунки содержали бесклеточную среду с эквивалентным количеством вещества. Далее раствор неприкрепившихся клеток удаляли, а лунки дважды промывали 200 мкл стерильного физиологического раствора, подсушивали воздухом и добавляли по 150 мкл на лунку 0.1% раствора кристаллического фиолетового. Окрашивание проводили в течение 30 минут, после чего краситель удаляли, а лунки пятикратно промывали дистиллированной водой. Планшеты сушили на воздухе в течение 1 часа. Для количественного определения биопленок использовали 200 мкл 96% этанола, внесенного пипеткой в каждую лунку. Через 5 мин 125 мкл раствора

переносили в отдельный планшет и измеряли OD_{540} с помощью спектрофотометра xMark™ Bio-Rad.

Общее биопленкообразование (ОБ) или массу биопленок рассчитывали по формуле:

$$ОБ = OD_{\Pi} - OD_{к},$$

где OD_{Π} – 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.

2.9. Оценка влияния веществ на чувствительность бактерий к перекиси водорода

Для определения влияния веществ на чувствительность бактерий к перекиси водорода культуру выращивали в колбах на 250 мл. В экспоненциальной фазе роста в колбу вносили испытуемое вещество и через 15 минут после этого перекись водорода (конечная концентрация 2 мМ). Каждые 15 минут в течение 2 часов проводилось измерение OD_{600} для расчета удельной скорости роста.

2.10. Определение способности веществ к аутоокислению с образованием перекиси водорода

Скорость образования перекиси водорода в фосфатной среде определяли с помощью пероксидазы хрена и красителя Amplex Red (AR/HRP) (Seaver & Imlay, 2001). Образец объемом 10 мкл разводили в 3,99 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 7.8) и инкубировали на ротационном шейкере в течение 30 мин при 37°C. 1.35 мл полученного раствора инкубировали в течение 5 минут с 0.75 мл красителя Amplex Red (200 мкМ) и 0.75 мл раствора пероксидазы хрена (0.02 мг/мл). Содержание H_2O_2 в пробах измеряли на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (λ_{ex} 563 нм и λ_{em}

587 нм) в начале и через 30 мин после инкубации. Концентрацию H_2O_2 рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных растворов H_2O_2 .

2.11. Определение уровня внеклеточного глутатиона

Для определения уровня внеклеточного глутатиона суспензию клеток отбирали по 1,5 мл и пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм. Измерение проводили с помощью метода рециркуляции 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (DTNB) - глутатионредуктазы. 240 мкл пробы добавляли к смеси 820 мкл буфера фосфата натрия (рН 7.5), 120 мкл DTNB и 6 мкл глутатионредуктазы. Анализ начинали добавлением 12 мкл NADPH на спектрофотометре Shimadzu UV-1700. Изменение OD_{412} за 6-минутный период использовали для расчета общего глутатиона по калибровочным кривым, построенным по стандартным растворам глутатиона.

2.12. Оценка изменения мембранного потенциала клеток

Изменения мембранного потенциала ($\Delta\psi$) оценивали с помощью $\Delta\psi$ - чувствительного флуоресцентного красителя DiBAC (бис-(1.3-дибутилбарбитуратовая кислота-триметиноксонол) (Smirnova et al., 2015).

1.8 мл суспензии клеток смешивали с 20 мкл раствора DiBAC (100 мкг/мл) и инкубировали в течение 10 минут в темноте при температуре 37°C. Для приготовления препарата 8 мкл смеси наносили на предметное стекло, покрытое 1% агарозой, приготовленной на среде M9. Подсчет клеток производили на флуоресцентном микроскопе Leica DM2000 (фильтр-система I3, возбуждение – λ 450-490 нм, эмиссия – λ 515 нм). Общее количество клеток рассчитывали в проходящем свете с помощью программы Leica Application Suite.

2.13. Измерение парциального давления кислорода и уровня внеклеточного сульфид-иона

Уровень растворенного кислорода (dO_2) в культурах *E. coli* непрерывно измеряли непосредственно в колбах с помощью кислородного электрода Clarke InPro 6800 (Mettler Toledo). 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 ХС-S²⁻-001 (Сенсорные Системы, Россия) и электрода сравнения и компьютерного рН/иономера срХ-2 (ИБП Пущино, Россия). Концентрацию сульфидов в среде рассчитывали по стандартной кривой, построенной с известными количествами Na₂S (Tyulenev et al., 2018).

2.14. Секвенирование микробиома кишечника крыс

Секвенирование образцов кала крыс проводили в институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН при непосредственным участием автора диссертационной работы.

Замороженные образцы помещали в контейнер со льдом для разморозки на 30 минут. Шпателем отбирали навеску образца массой 10 мг и помещали в пробирки для гомогенизации, содержащие керамические шарики MagNA Lyser Green Bead (Roche, Швейцария). К навеске образца добавляли 500 мкл лизирующего буфера MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (Roche, Германия). Далее образцы гомогенизировали с помощью автоматического гомогенизатора MagNA Lyser (Roche, Швейцария) согласно инструкции производителя, после чего добавляли 20 мкл протеиназы К (Qiagen, Германия) и инкубировали в течение 30 минут при 65°C, затем еще 10 минут при 95°C. Затем образцы центрифугировали при 12000 об/мин в течение 2 минут. Из полученного супернатанта (400 мкл) выделяли тотальную ДНК на приборе для автоматического выделения нуклеиновых кислот Magna Pure (Roche, Швейцария) с использованием реагентов

MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche) согласно инструкции производителя. Выделенную ДНК хранили при -20°C . Для качественной и количественной оценки ДНК использовали NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Подготовка 16S метагеномных библиотек осуществлялся в соответствии с протоколом 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США). Первый раунд амплификации переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК осуществляли с использованием прямого (TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG) и обратного (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC) праймеров по программе амплификации (амплификатор Biorad T100, США): 95°C — 3 мин; 30 циклов: 95°C — 30 с, 55°C — 30 с, 72°C — 30 с; 72°C — 5 мин; 4°C . Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием шариков Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) в соответствии с протоколом производителя.

Второй раунд амплификации для двойного индексирования образцов осуществляли с использованием комбинации специфических индексов Nextera XT Index kit (Illumina, США). Программа амплификации (амплификатор Biorad T100): 95°C — 3 мин; 8 циклов: 95°C — 30 с, 55°C — 30 с, 72°C — 30 с; 72°C — 5 мин; 4°C .

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием шариков Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию полученных библиотек определяли с помощью флуориметра Qubit® 2.0 (Invitrogen, США) с использованием набора dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Invitrogen, США). Очищенные ампликоны смешивали эквимольно, качество приготовленного пула библиотек проводили на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) в режиме парно-концевых прочтений.

Последовательности прочтений (fastq) были получены из BCL-файлов при помощи программного обеспечения Illumina MiSeq Reporter 2.6. Поскольку качество секвенирования значительно снижалось в 3'-концевых областях, было принято решение о предварительном объединении прямых и обратных прочтений, до дальнейшего анализа в DADA2. Объединение прочтений было выполнено при помощи средства MeFiT 1.0. с изменёнными параметрами запуска (threshold for mismatch-ratio 0.5; minimum overlap length 30). Далее были удалены последовательности праймеров при помощи cutadapt 3.2; отфильтрованы прочтения, содержащие N. Дальнейший анализ последовательностей проводился с использованием пакета DADA2 1.30 (в среде R 4.3.3). В частности, была 1) проведена фильтрация объединённых прочтений по качеству; 2) выполнена коррекция ошибок; 3) выделены последовательности ASV (amplicon sequence variant); 4) исключены потенциальные химерные ASV.

При анализе данных DADA2 были использованы следующие параметры фильтрации: truncLen 0, maxN 0, minQ 5 (удаление ридов, содержащих позиции с качеством ниже 5), truncQ 0, maxEE 2 (максимальное ожидаемое число ошибок – не более 2 на ампликон). 3'-концевая обрезка прочтений в DADA2 не проводилась, поскольку последовательности были предварительно объединены в один ампликон. Фильтрация низкокачественных прочтений осуществлялась за счёт параметров maxEE и minQ. В среднем, фильтрацию в DADA2 прошли 65% исходных прочтений (от 18 до 194 тыс. на образец; в среднем 70 тыс. прочтений на образец). С целью исключения некорректно объединённых прочтений (аномальной длины), в DADA2 был установлен порог по длине 350 нукл. (при ожидаемой длине ASV 400-420 нукл., не считая праймеров). Следует отметить, что из 4812 ASV (без химер) лишь 3 ASV (на которые приходилось менее 0.001% прочтений) имели длину в диапазоне 350-400 нукл. Это говорит о корректном объединении большинства прочтений в единый ампликон.

Несмотря на то, что 56% ASV были классифицированы как химерные, им соответствовало только 4.5% всех прочтений. Это вполне ожидаемо, поскольку

вариативность химерных прочтений весьма высока. В общей сложности, после удаления химер, было отобрано 4812 ампликонных вариантов (ASV), которые затем были аннотированы.

Достаточность глубины секвенирования (количества прочтений на образец) проверяли с помощью анализа кривых разрежения (rarefaction curves; на уровне ASV). Для всех без исключения образцов наблюдался выраженный выход на плато. Результаты этого анализа также говорят в пользу успешного устранения большинства ошибок секвенирования, возникших вследствие исходного падения качества секвенирования к 3'-концам или предварительного объединения прочтений (что могло затруднить коррекцию ошибок). В противном случае бы не наблюдалось выхода на плато, и имело место плавное нарастание числа ASV с количеством прочтений.

Дальнейшая таксономическая аннотация ASV проводилась при помощи наивного байесовского классификатора RDP (RDP naïve Bayesian classifier), встроенного в пакет DADA2. Пороговое значение бутстреп-достоверности (bootstrap confidence) было установлено на 70% в виду возможных остаточных ошибок в последовательностях ASV. В качестве референсной базы последовательностей 16S была использована Silva версии 138.1. Аннотация до уровня вида осуществлялась также при помощи DADA2 (assignSpecies) на основании требования 100% гомологии ASV с последовательностями в референсной базе. На уровне филумов, классов и порядков были аннотированы ASV, охватывающие >99% прочтений, прошедших фильтрацию. На уровне семейства эта цифра снизилась до 88% (для большинства образцов этот диапазон составил 80-95%), а на уровне рода – до 68% (40-95%). До уровня вида были аннотированы ASV, соответствующие лишь 23% прочтений (от 1% до 78% для разных образцов), что также ожидаемо для исследуемых участков V3-V4.

Дальнейший анализ включал подсчёт индексов альфа-разнообразия (Шеннона, Симпсона, Chao1, ACE), оценку бета-разнообразия по различным метрикам (Брея-Кёртиса, Жаккара), с привлечением пакетов vegan 2.6.4, fossil 0.4.0.

Был проведён сравнительный анализ таксономической структуры микробиомов различных групп образцов при помощи пакета ALDEx2 1.34. Ввиду выраженной внутригрупповой гетерогенности (отсутствия нормального распределения образцов внутри групп) основное внимание уделялось значениям p-value, полученным ранговым тестом Манна-Уитни (в рамках пакета ALDEx2), в тех случаях когда размер групп оказывался достаточным.

Помимо этого, рассчитаны значения p-value по тесте Манна-Уитни для долей таксонов, нормированных на общее число прочтений на образец (TSS, total sum scaling), без использования ALDEx2. Для большинства таксонов, представленных на достаточно высоком уровне ($>0.2\%$), были получены результаты, сходные с ALDEx2. 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.

2.15. 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 $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РАДИКАЛСВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И МИНИМАЛЬНЫЕ ИНГИБИРУЮЩИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ (МИК) ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Особенности структуры исследуемых веществ. Исследуемые вещества относятся к четырем группам (их общие структуры представлены на рисунке 6). Все они содержат базовый дикетоенаминовый фрагмент. Тип заместителей вокруг структурного фрагмента ядра, а также его жесткость/гибкость и стереоизомерия вокруг двойной связи определяют различие структур (табл. 2).

Группа 1 разделена на подгруппы а и б. В соединениях группы 1а («енамины») в растворе возможно свободное вращение заместителей вокруг всех одинарных связей, поэтому возможен переход Z- и E-изомерных форм друг в друга в результате таутомерии, а также возможно сопряжение функциональной группы NH с ароматическим кольцом. Соединения группы 1б содержат енольную функциональную группу вместо енаминной.

В соединениях групп 2 и 3 указанный выше дикетоенаминовый фрагмент участвует в образовании гетероциклической системы (оксазина или пиперазина), конденсированной с ароматическим кольцом (группа 2) или неаннелированной (группа 3). Свободное вращение вокруг связей C-N в этих соединениях невозможно, однако сохраняется свободное вращение ацильного заместителя R1-C=O, а также возможность перехода Z- и E-форм друг в друга. Существенным отличием строения этих двух групп является наличие или отсутствие ароматического заместителя у атома азота енаминного фрагмента и, как следствие, возможность сопряжения группы NH с ароматическим кольцом (группа 2) или отсутствие такой возможности (группа 3).

Соединения группы 4 (замещенные 4-хинолоны) имеют наиболее жесткую структуру: только ацильный заместитель R1-C=O или его аза-аналог R1-C=N может свободно вращаться, остальные атомы, образующие дикетоенаминовый фрагмент, вовлечены в 4-хинолоновую гетероциклическую систему, которая жестко закреплена и превращение Z-E вокруг двойной связи становится

невозможным. Одно соединение группы 4 отличается отсутствием в его структуре свободно вращающейся ацильной группы: соединение CBR-376 ($X+Y=-O-N=$) вместо свободно вращающихся заместителей в положениях 2 и 3 содержит 1,2-оксазиновый фрагмент, аннелированный с 4-хинолоновым ядром.

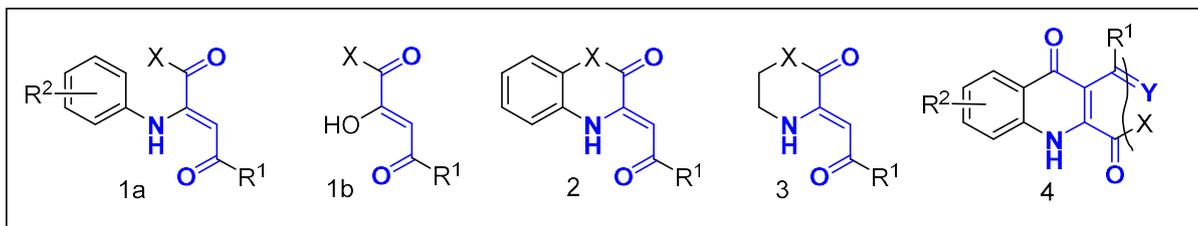


Рисунок 6 – Общие структуры исследуемых веществ.

Таблица 2 – Радикалсвязывающая активность и минимальные ингибирующие концентрации (МИК) исследуемых веществ.

Группа 1a	R ¹	R ²	X		ААРН (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
<u>CBR-366</u>	t-Bu	n-Br	OMe		84,2±4	19±2,1	>10
Группа 1b	R ¹		X				
<u>CBR-371</u>	<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					
<u>CBR-288</u>	O	n-FC ₆ H4			50,2±1,7*	74,8±0,8**	1
<u>CBR-384</u>	O	t-Bu			87,5±1,3	69±0,5**	0,5
CBR-385	O	C6H5			81,2±6,2	71,4±1,9**	Nd ^M (>0,125)
<u>CBR-386</u>	O	Me			88,5±1,8	78±0,1**	0,25

Продолжение таблицы 2.

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
<u>CBR-124</u>	N-Me	<i>n</i> -ClC ₆ H ₄			73±1,9	1,5±0,3	>4
<u>CBR-125</u>	NH	<i>n</i> -ClC ₆ H ₄			82,3±1,7	5,2±0,7	>4
<u>CBR-382</u>	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
Группа 4	R ¹	X	Y	R ²			
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

Продолжение таблицы 2.

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

3.1. Радикалсвязывающая активность 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 классов (табл. 2). В этом тесте наибольшую активность проявляли соединения группы 2, для которых значения РСА изменялись от 53% (СВР-64) до 78% (СВР-386). Соединения группы 3 показали низкую активность со значениями РСА от 1,5 до 5,2 %. Семь соединений группы 4 имели уровень РСА от низкого (3,1%), до близкого к нулевому (0,5%). Единственным образцом в этой группе, показавшим высокую активность связывания радикалов (76,7%), был трициклический СВР-376. Соединения группы 1 занимали промежуточное положение, показывая значения радикалсвязывающей активности от 19 до 59,2%.

Способность соединений предотвращать деградацию флуоресцеина пероксильными радикалами в тесте с ААРН была высокой для всех соединений из групп 1, 2 и 3 и (табл. 2), кроме СВР-368 из группы 1, который содержит электроноакцепторную группу COOC_2H_5 в енаминном фрагменте и оказался неактивным. Соединение СВР-123 группы 3 имело самую высокую активность - 94%. Из группы 4 только соединение СВР-376 проявило активность в отношении радикалов ААРН.

Предполагается, что тест, основанный на способности связывать радикал DPPH, отражает смешанный механизм действия: механизмы переноса водорода (НАТ) и переноса 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.

В тест-системе, в которой в качестве инициатора образования радикалов используется AAPH, 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). За исключением CBR-368, все эти соединения имели PCA в диапазоне от 44,3 до 94,0 %. Неактивность CBR-368 можно объяснить наличием электроноакцепторной группы COOC_2H_5 . Высокую активность следует отметить для соединений группы 3, которые оказались неэффективными в тесте на связывание радикала DPPH. Для соединений группы 4, кроме CBR-376, наблюдалось увеличение скорости деградации флуоресцеина. Представляет интерес изучение обнаруженного эффекта в дальнейшем.

3.2. Антимикробная активность веществ.

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 7 соединений (табл. 2). Наименьшими значениями МИК обладают соединения CBR-386 и CBR-376, представители двух разных групп. 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 ариламиной группы в положении 2.

ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИЙ *E. COLI* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

На основании полученных данных о радикалсвязывающей и антимикробной активности веществ было выбрано 10 соединений для дальнейшего исследования.

CBR-371 и CBR-366 относятся к первой группе. Эти соединения, как и другие представители данной группы, способны связывать оба радикала, но в разной степени: CBR-371 более активен в тесте с DPPH \cdot , а CBR-366 - с AAPH \cdot . МИК для соединения CBR-371 равна 1 мМ, CBR-366 не ингибировал рост *E. coli* BW25113 даже при концентрации 10 мМ.

Соединения CBR-384, CBR-386 и CBR-288 относятся ко второй группе и имеют в одном и том же положении гетероциклической системы на основе 1,4-бензоксазина трет-бутильный, метильный и п-фторфенильный заместители соответственно. Данные соединения проявили радикал-связывающую активность в обоих тестах. Значения МИК для них составили 0,5, 0,25 и 1 мМ, соответственно.

Представители третьей группы CBR-124, CBR-125 и CBR-382 являются близкими структурными аналогами. CBR-124 и CBR-125, оба – замещенные пиперазины, а CBR-382, замещенный оксазин. Для всех трех соединений было характерно наличие способности связывать радикал AAPH \cdot , но не DPPH \cdot . Значение МИК для данных соединений было больше 4 мМ.

Соединения CBR-11 и CBR-376 относятся к четвертой группе. CBR-11 является классическим представителем группы и его свойства близки к свойствам еще 8 представителей: данные соединения не способны связывать радикал DPPH \cdot . Не выявлено антирадикальной активности этих соединений в тесте с AAPH \cdot . МИК для CBR-11 не была определена из-за его плохой растворимости. Максимальная исследованная концентрация, при которой наблюдался рост клеток, составила 0,25 мМ. Соединение CBR-376 значительно отличалось по своим свойствам от других представителей группы: оно проявило активность в тестах с DPPH \cdot и AAPH \cdot . Значение МИК составило 0,25 мМ.

Исследование влияния веществ на ростовые характеристики проводили в 96-луночных планшетах.

4.1. Влияние веществ на ростовые параметры *E. coli* BW25113

Для более полной характеристики действия веществ на рост бактерий следили как за изменениями оптической плотности (OD_{600}), так и удельной скорости роста (μ). При выращивании *E. coli* BW25113 в планшетах без воздействия исследуемых веществ (контроль) выделяются 3 фазы: кратковременная первоначальная фаза, в течение которой бактерии растут с максимальной удельной скоростью роста (экспоненциальный рост); вторая фаза, в которой скорость роста в течение 15 мин снижается примерно в 2,5 раза, и третья фаза, когда бактерии растут с пониженной скоростью до конца всего периода наблюдения (Рис. 7).

Исследуемые соединения по-разному влияли на рост бактерий, но фаза быстрого снижения скорости роста наблюдалась во всех случаях. Слежение за изменением оптической плотности (OD_{600}) показало, что накопление биомассы в культурах *E. coli* BW25113, растущих в планшетах, при действии 0,5 мМ CBR-366 и CBR-371 (Группа 1) ингибируется по сравнению с бактериями, обработанными только ДМСО, на 36 и 68%, соответственно ($P < 0.05$) (Рис. 7А).

Анализ изменения удельной скорости роста (μ) свидетельствовал о том, что в обработанных культурах снижение скорости роста на начальной стадии культивирования было более значительным, чем в контроле. Обращает внимание обратимость этих снижений в обработанных культурах с последующим повторным снижением. 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 ($P < 0,05$) (Рис. 7Б). Бактериостатическое действие CBR-371 подтверждается данными по измерению КОЕ. У бактерий, обработанных этим веществом, значение КОЕ было в 2 раза

меньше, чем при добавлении только ДМСО ($P < 0,05$) (Рис. 11). Не отмечено влияния CBR-366 на колониобразующую способность испытуемых бактерий.

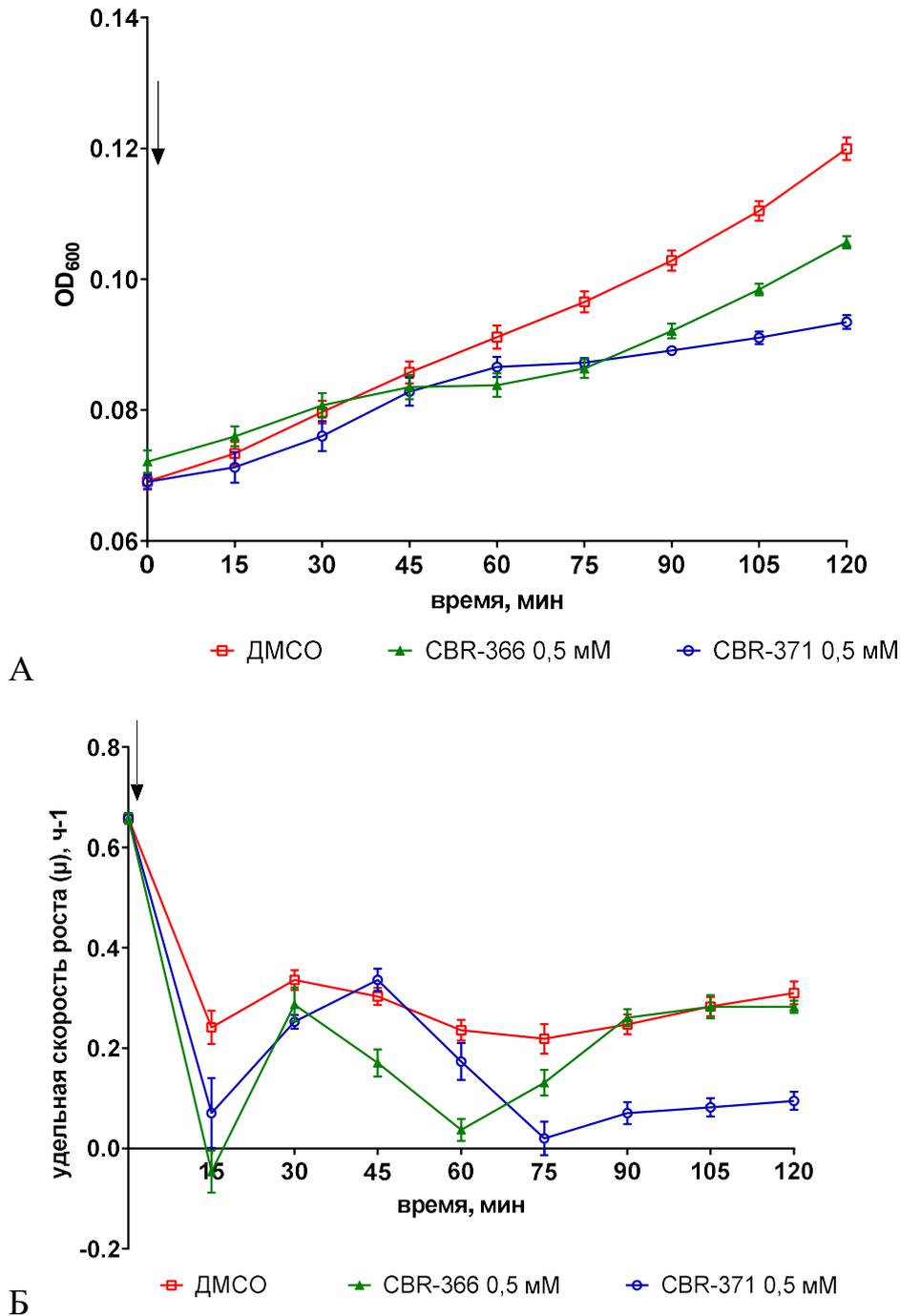


Рисунок 7 – Влияние веществ 1 группы на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) *E. coli* BW25113 в планшетах. Стрелки показывают момент добавления вещества.

Из трех испытанных веществ 2 группы наименьшее накопление биомассы к концу культивирования наблюдалось при действии 0,5 мМ СВР-384. По сравнению с контролем этот показатель в обработанной культуре снижался на 40% ($P < 0.05$) (Рис. 8А).

К концу инкубации все культуры, обработанные тремя веществами из второй группы, росли с такой же скоростью, как и культура, обработанная ДМСО (Рис. 8Б). Следует отметить, что через 15 мин после обработки СВР-384 наблюдалась кратковременная остановка роста. Сравнение данных, представленных на Рис. 8А и 8Б, позволяет предположить, что более низкое накопление биомассы к концу культивирования при действии СВР-384 связано с кратковременным, но полным ингибированием роста в начальной фазе культивирования. Одновременно, у бактерий, обработанных СВР-384, наблюдалось достоверное снижение значения КОЕ по сравнению с ДМСО в 5,7 раз ($P < 0.05$) (Рис. 11). В совокупности, результаты свидетельствуют о бактериостатическом действии СВР-384 на растущие *E. coli*. Кратковременное снижение скорости роста происходило также при действии 0,25 мМ СВР-386 (Рис. 8Б), но, как и СВР-288 (0,1 мМ), это вещество не влияло на значение КОЕ (Рис. 11).

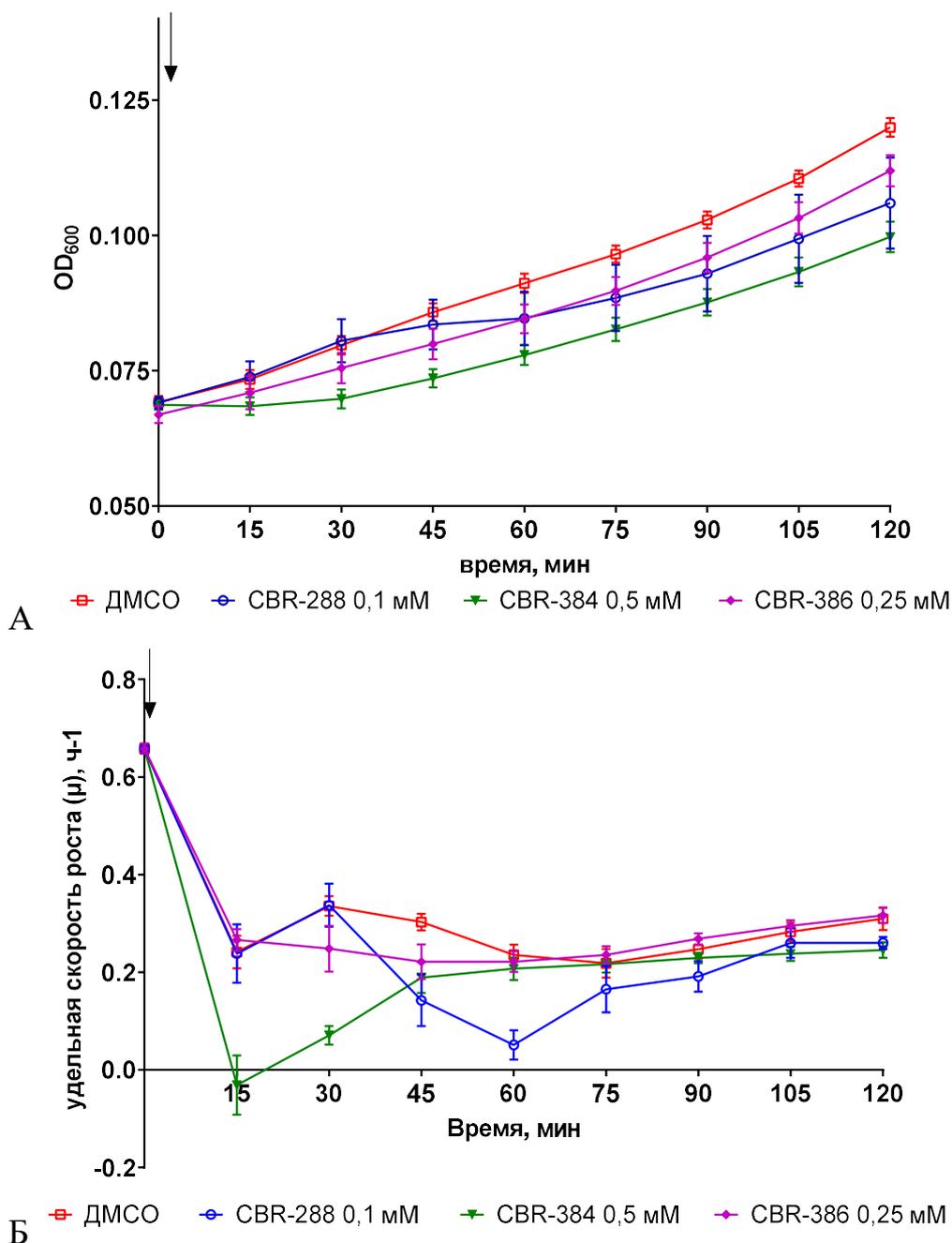


Рисунок 8 – Влияние веществ 2 группы на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) *E. coli* BW25113 в планшетах. Стрелки показывают момент добавления вещества.

Обработка *E. coli* веществами, принадлежащими к третьей группе (СВR-124 (0,5 мМ) и СВR-125 (0,25 мМ), не влияла на накопление биомассы, скорость роста и КОЕ (Рис. 9, 11). Другое вещество из этой группы, СВR-382 (0,5 мМ), также не влияло на накопление биомассы, но вызывало кратковременное снижение скорости

роста на 60 мин культивирования (Рис. 9 Б) и повышало значение КОЕ по сравнению с контролем на 20% (Рис. 11).

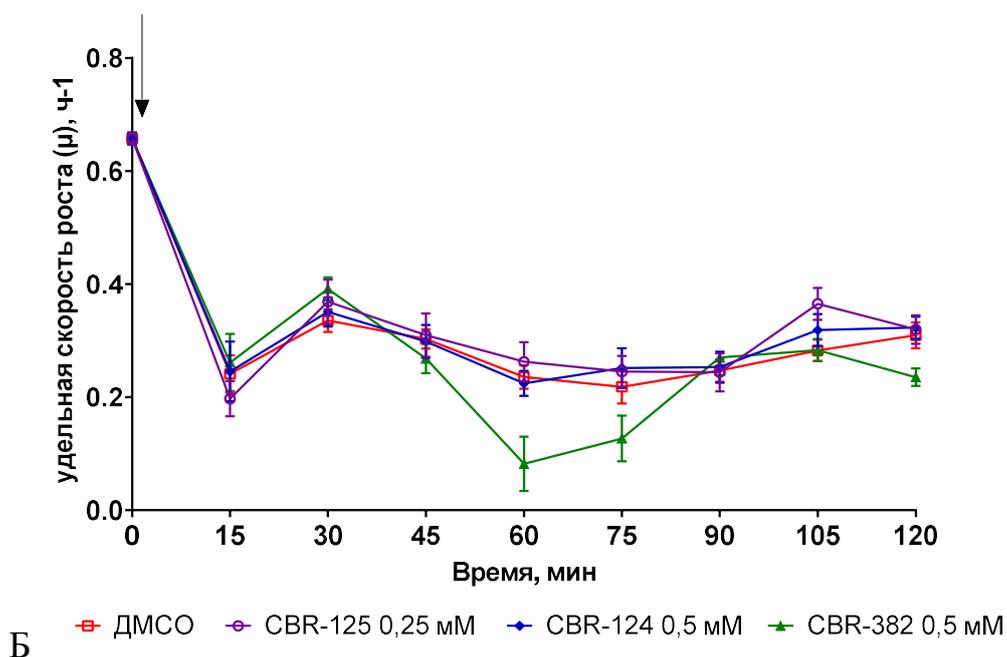
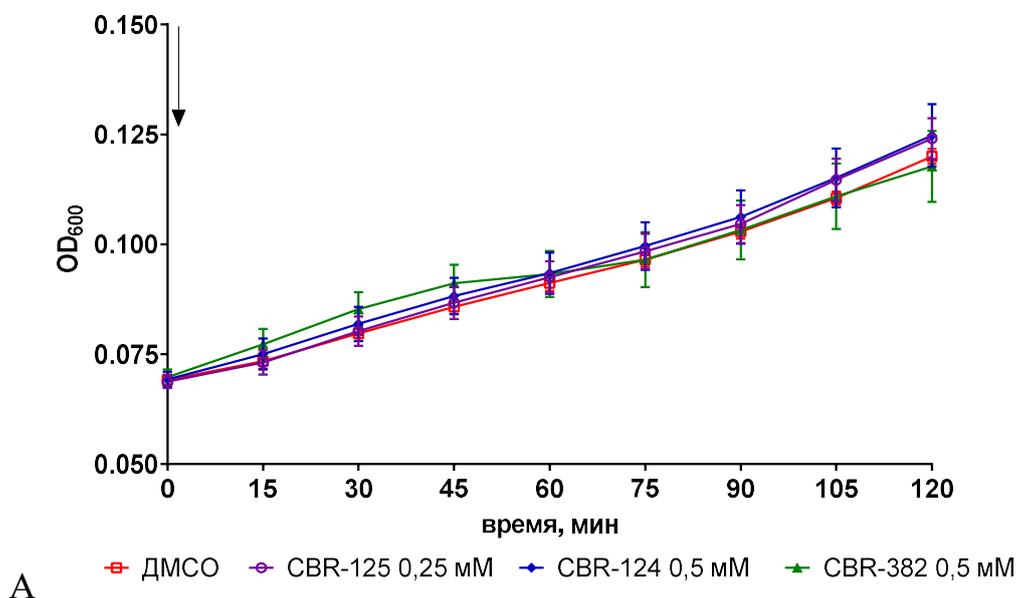


Рисунок 9 – Влияние веществ 3 группы на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) *E. coli* BW25113 в планшетах. Стрелки показывают момент добавления вещества.

Соединение CBR-11 (0,25 мМ) из четвертой группы не оказывало влияния на накопление биомассы, скорость роста и КОЕ (Рис. 10). 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 ($P < 0.05$) (Рис. 11).

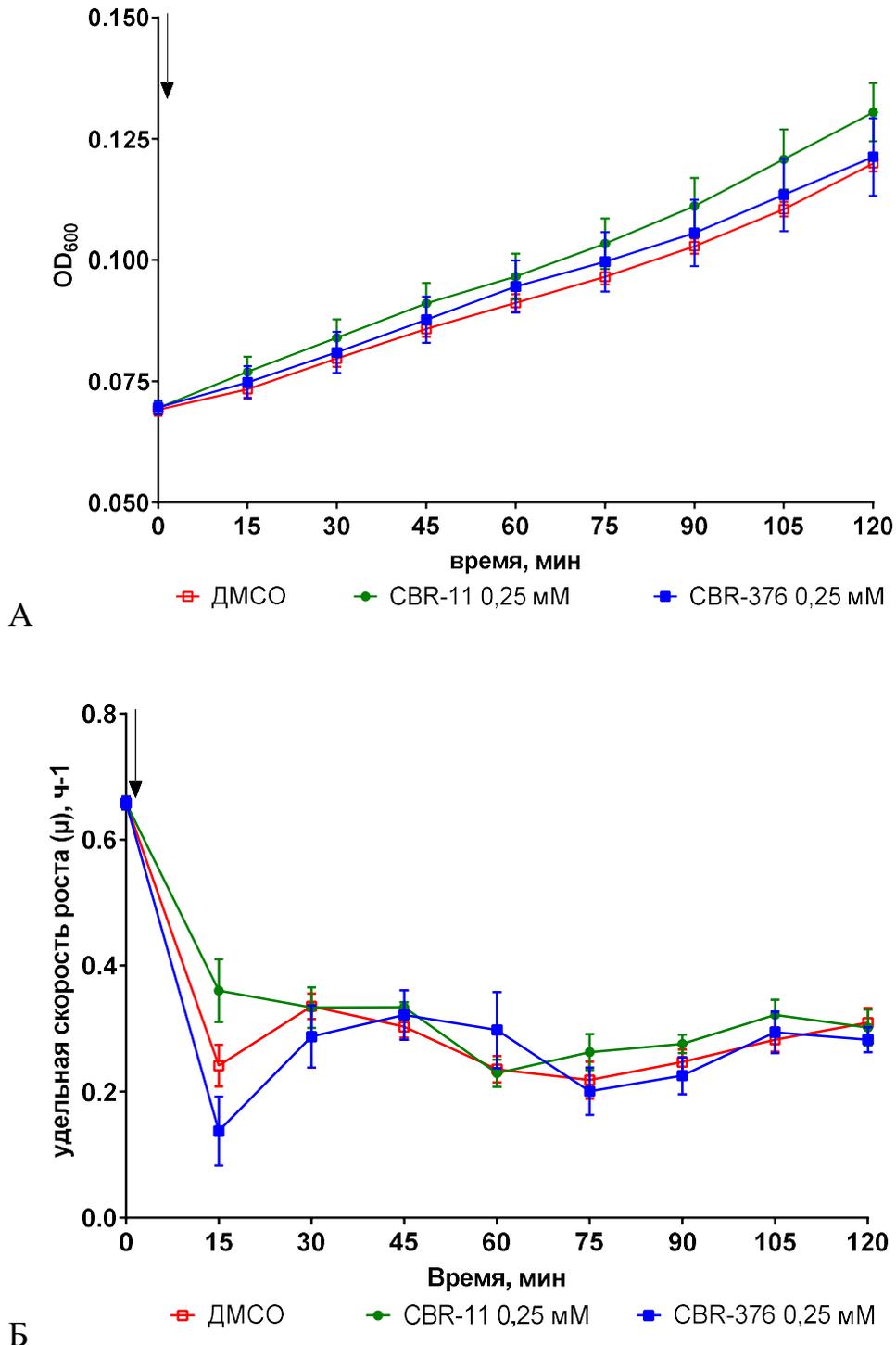


Рисунок 10 – Влияние веществ 4 группы на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) *E. coli* BW25113 в планшетах. Стрелки показывают момент добавления вещества.

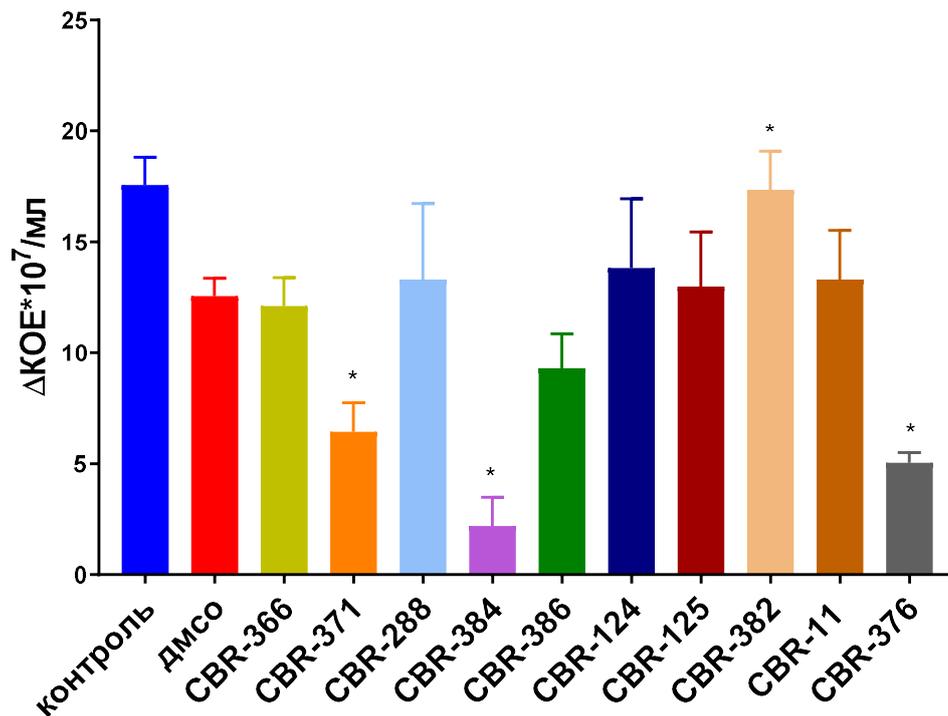


Рисунок 11 – Изменение КОЕ через 2 часа после добавления исследуемых веществ в растущую культуру *E. coli* BW25113.

* - значения достоверно отличаются от ДМСО ($p < 0,05$).

4.2. Биопленкообразование бактерий *E. coli* BW25113 при воздействии исследуемых веществ

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 ($P < 0,05$) (Рис. 12). Как показано выше, первые два вещества оказывали также бактериостатическое действие (Рис. 7, 8).

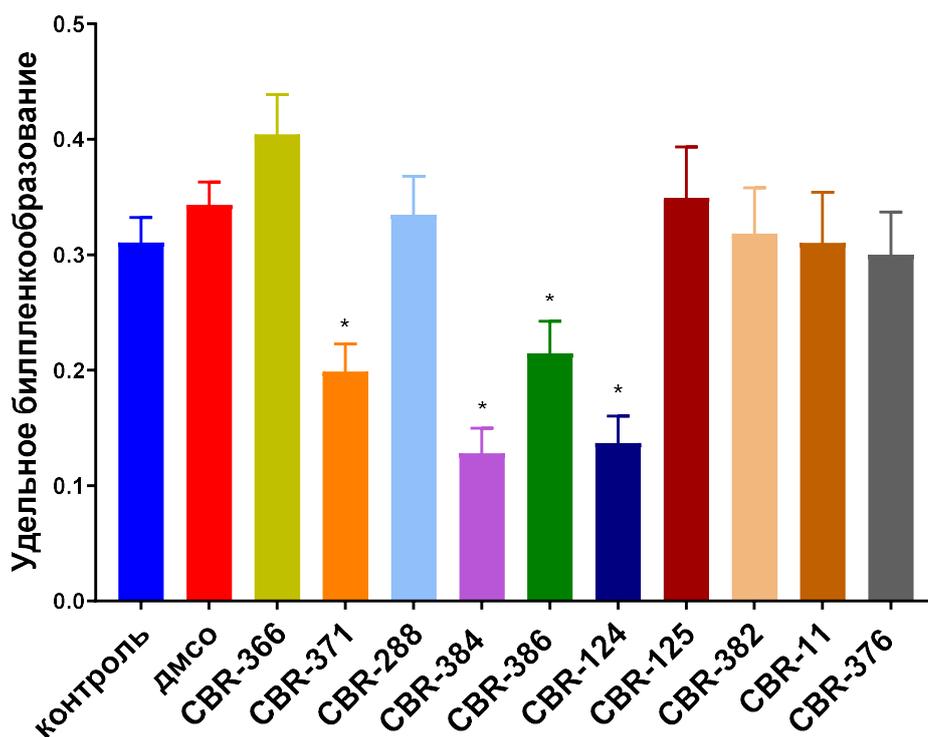


Рисунок 12 – Удельное биопленкообразование *E. coli* BW25113 при действии исследуемых веществ.

* - значения достоверно отличаются от ДМСО ($p < 0,05$).

4.3. Генотоксическое действие исследуемых соединений

Наличие генотоксического действия у веществ оценивали в SOS-хромостесте. SOS-ответ - это глобальный ответ бактерий на повреждение ДНК, при котором клеточный цикл останавливается, и индуцируются репарация ДНК и мутагенез. В работе использовали генноинженерный штамм *E. coli* NM3012, несущий транскрипционное слияние гена *sulA*, являющегося медиатором филаментации в SOS-ответе, с геном *lacZ* (Quillardet et al., 1982). Изменение активности гена *sulA* оценивали колориметрически по образованию о-нитрофенола при действии β -галактозидазы на о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид. Положительным контролем служил антибиотик ципрофлоксацин, мишенью которого служит ДНК. Было установлено, что ни одно из исследованных соединений не увеличивало

экспрессию гена *sulA*, что свидетельствует об отсутствии у них генотоксического действия (Рис. 10).

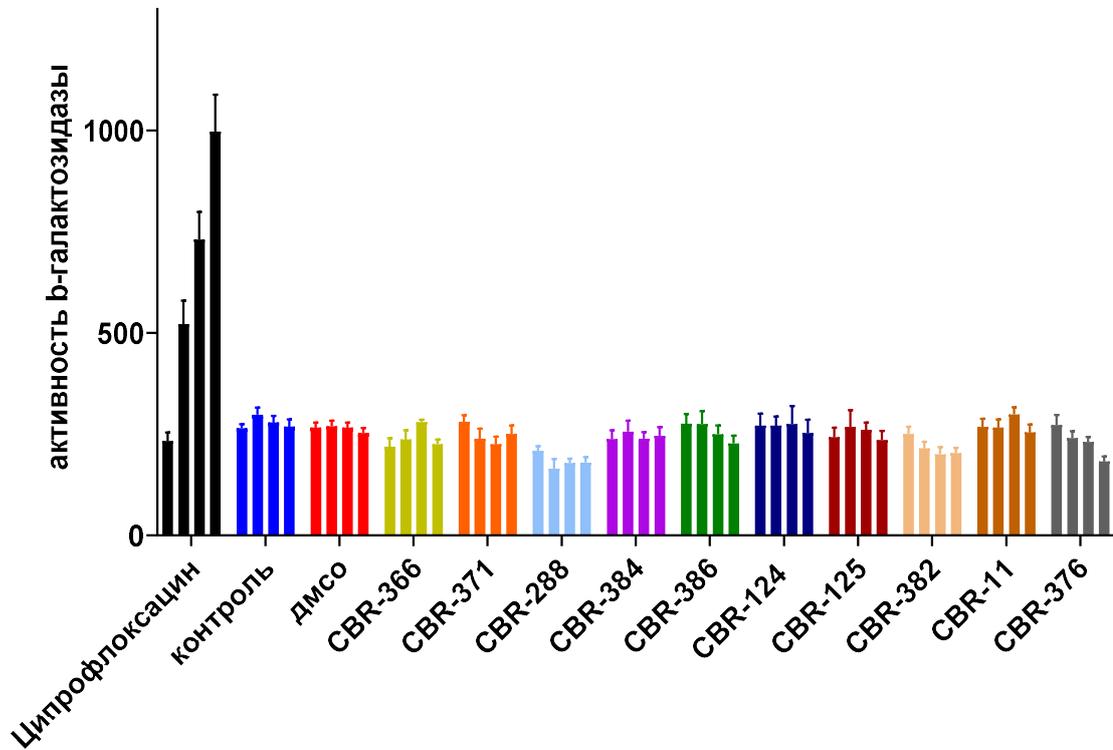


Рисунок 13 – Экспрессии гена *sulA* через 30, 60, 90 и 120 минут после обработки растущих *E. coli* NM3012 исследуемыми веществами.

ГЛАВА 5. ПРООКСИДАНТНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

5.1. Прооксидантная активность

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. Выбор этих веществ был рассмотрен в начале 4-й главы. В первом случае изучали 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*, которое оценивается колориметрически по изменению окраски реагента ОНФГ. Ген *katG*, кодирует каталазу НРІ, являющуюся одним из основных деструкторов перекиси водорода в растущих *E. coli*.

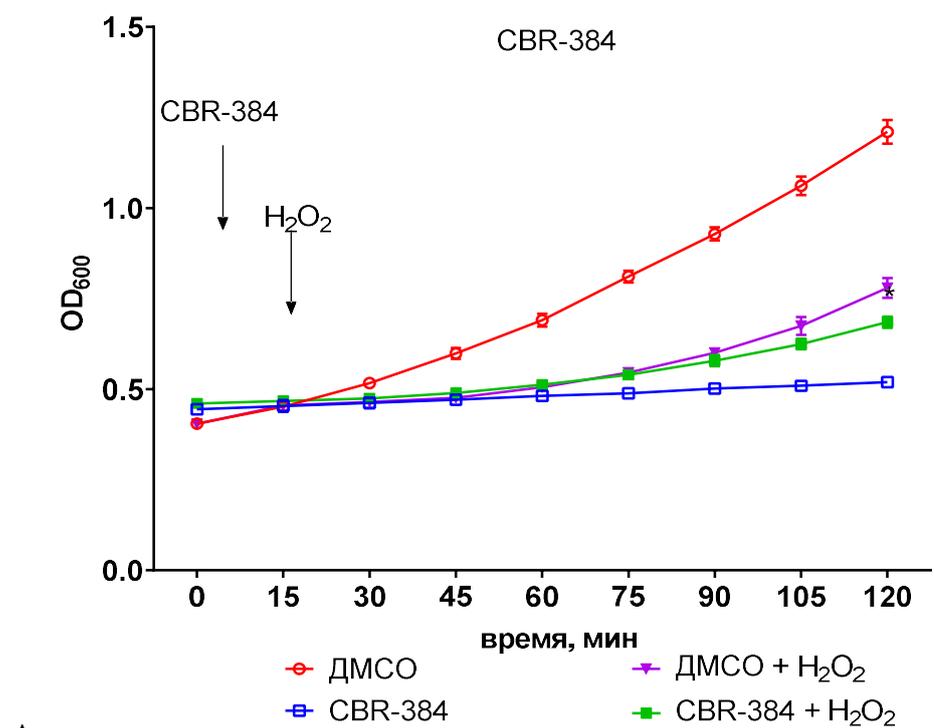
Соединения CBR-384, CBR-386 и CBR-376 исследовали в концентрациях, равных МИК. Для остальных соединений использовали максимальные концентрации, при которых вещества не выпадали в осадок. При воздействии исследуемых веществ на бактерии изменения экспрессии гена *katG* не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии у них прооксидантного действия.

5.2. Антиоксидантная активность исследуемых соединений.

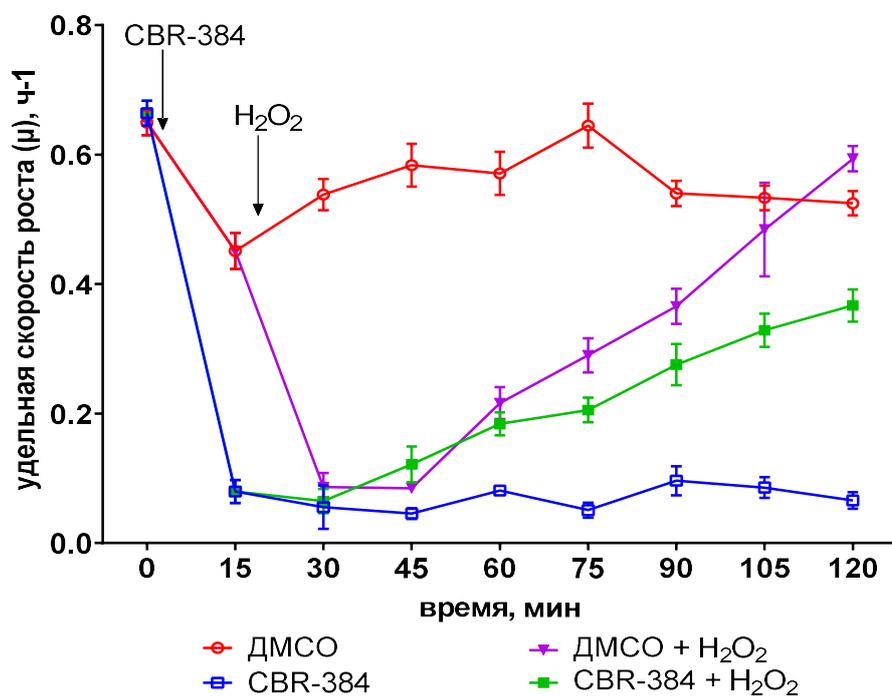
Антиоксидантное действие исследуемых соединений оценивали по их способности снижать ингибирующее действие перекиси водорода на рост бактерий *E. coli* NM3021. Предварительные эксперименты показали, что этот штамм обладает такой же чувствительностью к H₂O₂, как и родительский штамм *E. coli*

BW25113. В отличие от предыдущих экспериментов, в этом случае бактерии выращивали не в планшетах, а в колбах с интенсивным перемешиванием (150 об/мин), что обеспечивало высокое содержание кислорода в экспоненциальной фазе роста. В ранее проведенных экспериментах было показано, что в этих условиях бактерии проявляют более высокую чувствительность к действию H_2O_2 , чем при культивировании в планшетах.

Слежение за изменениями OD_{600} и скорости роста показало, что в этих условиях CBR-384 в концентрации, равной МИК, полностью и необратимо ингибировал рост *E. coli*. Добавление 2 мМ H_2O_2 в культуру, растущую без добавления испытуемых веществ, вызывало быстрое снижение скорости роста, но, в этом случае, процесс был обратимым и деструкция H_2O_2 приводила к постепенному повышению скорости роста до значения, близкого к тому, которое наблюдалось до обработки бактерий оксидантом. В конце культивирования значение OD_{600} в культуре, обработанной H_2O_2 , было на треть меньше, чем в контроле. Примечательно, что добавление H_2O_2 после CBR-384 значительно снижало ингибирующее действие этого вещества. С другой стороны, присутствие CBR-384 усиливало бактериостатическое действие H_2O_2 (Рис. 14).



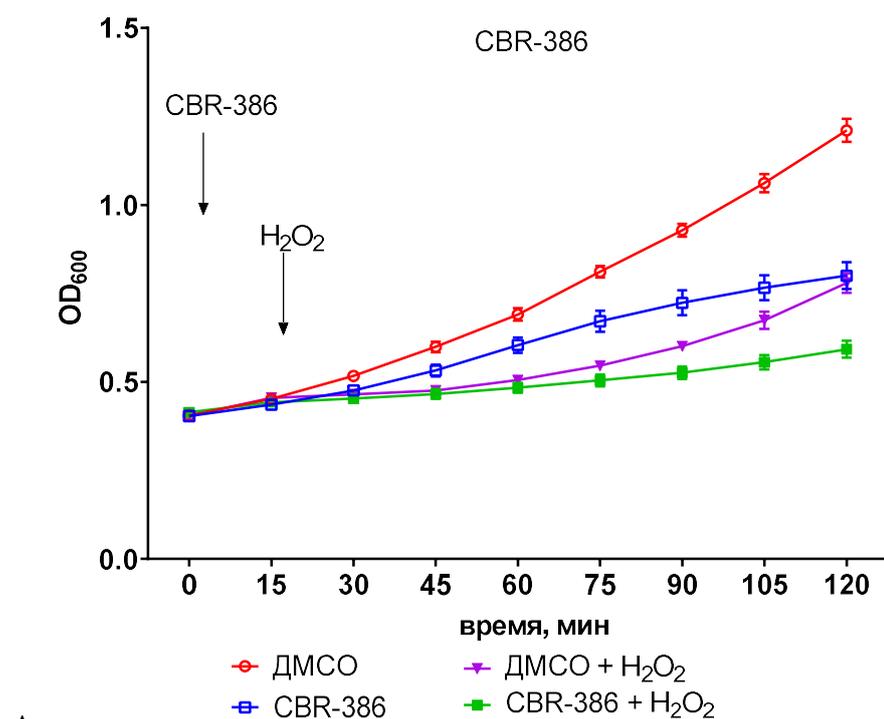
А



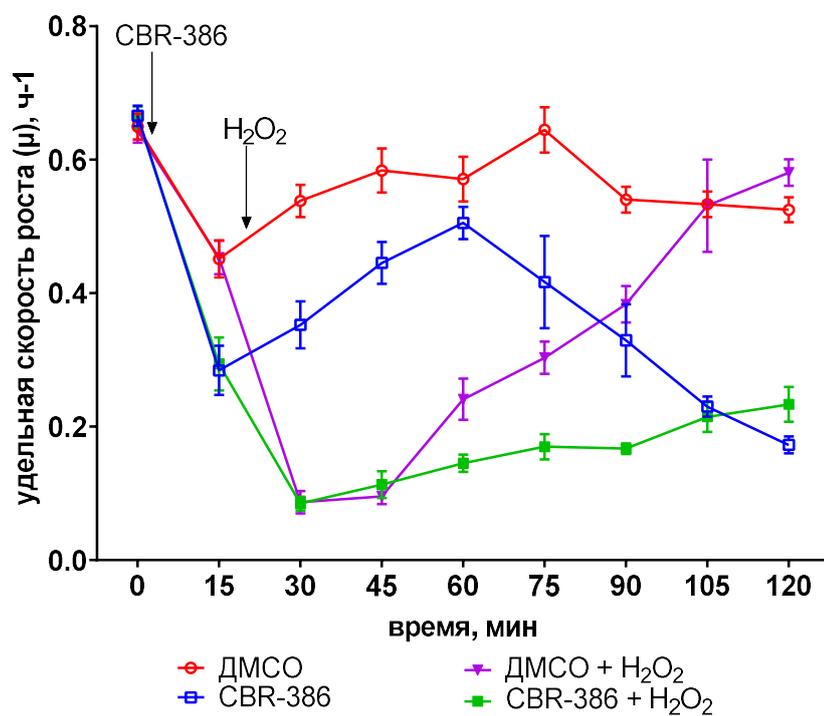
Б

Рисунок 14 – Влияние CBR-384 и H₂O₂ на накопление биомассы (А) и скорость роста (Б) бактериями *E. coli* NM3021, растущими в колбах.

В случае с CBR-386, обработка *E. coli* NM3021, растущих в колбе, ингибировала накопление биомассы на треть по сравнению с необработанной культурой. Влияние CBR-386 на скорость роста носило двухфазный характер: через 15 минут после его добавления в концентрации, равной МИК, скорость роста в колбе снижалась в 2,3 раза, к 60 минуте восстанавливалась до контрольных значений и затем постепенно снижалась к концу инкубирования до значения, примерно в 3 раза меньшего, чем в контроле. 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. 15). При уменьшении концентрации данных веществ в 10 раз наблюдалось снижение их ингибирующего действия на бактерии и отсутствие влияния на ингибирующее действие перекиси водорода.



А



Б

Рисунок 15 – Влияние CBR-386 и H₂O₂ на накопление биомассы (А) и скорость роста (Б) бактериями *E. coli* NM3021.

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. В качестве примера, на Рис. 16 показаны результаты измерения ростовых параметров при действии CBR-124.

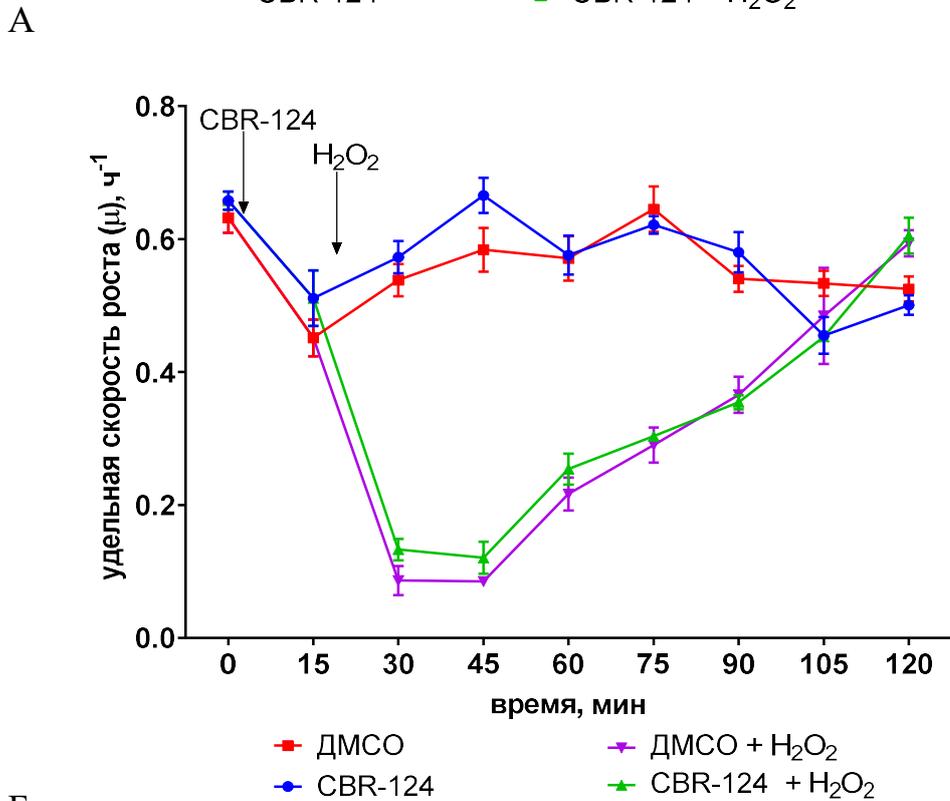
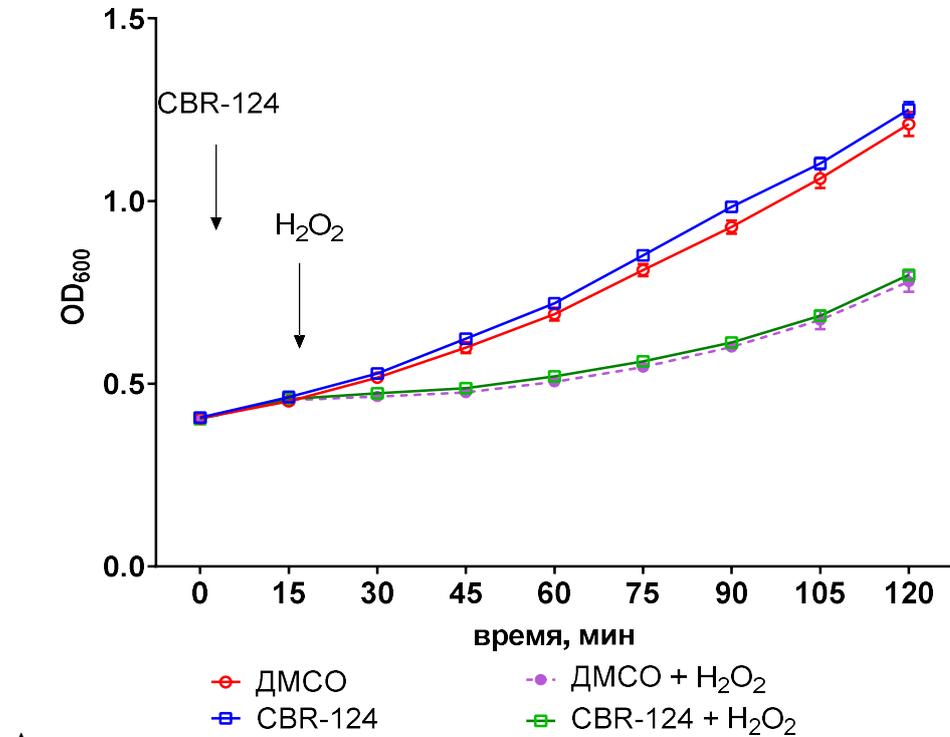


Рисунок 16 – Влияние CBR-124 и H₂O₂ на накопление биомассы (А) и скорость роста (Б) бактериями *E. coli* NM3021.

ГЛАВА 6. ОТВЕТ ЭНЕРГОДАЮЩИХ СИСТЕМ *E. COLI* НА ВОЗДЕЙСТВИЕ CBR-384 И CBR-386

6.1. Дыхательная активность бактерий при действии CBR-384 и CBR-386.

Для изучения влияния CBR-384 и CBR-386 на дыхание бактерий было прослежено изменение содержания растворенного кислорода в растущей культуре *E. coli* BW25113 при действии этих веществ, в концентрациях равных МИК. Парциальное давление кислорода (dO_2) измеряли непосредственно в колбах полярографическим методом с помощью электрода Кларка. Данные непрерывно обрабатывались в режиме реального времени с помощью аппаратно-программного комплекса (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. 17), что свидетельствовало о снижении дыхательной активности клеток (Раздел 4.1).

В течение первых 15 мин после добавления CBR-386 в растущую культуру *E. coli* уровень кислорода возрастал, а затем начинал падать с такой же скоростью, как у родительского штамма. Примерно через 50 мин после добавления CBR-386 наблюдалось повторное и кратковременное возрастание dO_2 культуре, после чего его содержание устанавливалось на постоянном уровне. Наблюдаемые изменения dO_2 указывают на то, что действие CBR-386 также сопровождалось снижением дыхательной активности *E. coli*, хотя и в меньшей степени, чем в случае с CBR-384. Это соответствует и меньшей бактериостатической активности CBR-386, по сравнению с CBR-384 (Раздел 4.1).

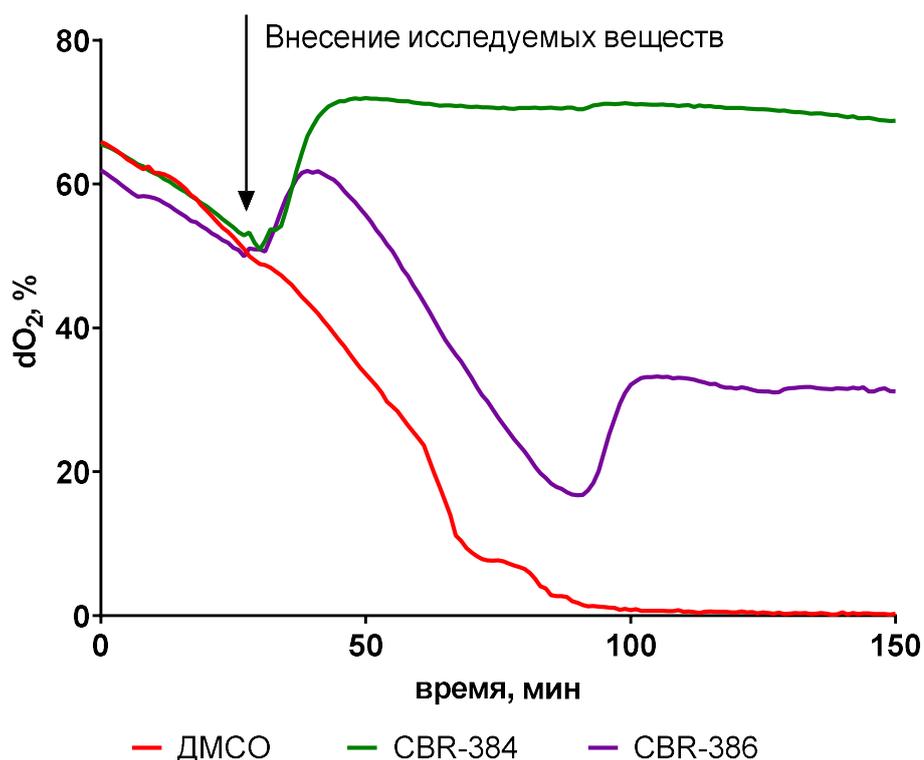


Рисунок 17 – Влияние CBR-384 и CBR-386 на содержание растворенного кислорода в культуре *E. coli* BW25113.

6.2. Изменение мембранного потенциала бактерий при воздействии CBR-384 и CBR-386

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 $\frac{1}{2}$ МИК, оценивали с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя DiBAC₄(3) (Smirnova et al., 2015). Отрицательно заряженный DiBAC₄(3) не может проникнуть в активные клетки из-за своего внутреннего отрицательного заряда.

Следовательно, клетки, окрашенные DiBAC4(3), считаются деполяризованными клетками (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. 18, 19).

В аэробных условиях генерация мембранного потенциала бактериями *E. coli* осуществляется, главным образом, за счет работы дыхательной цепи. В этой связи, обращает внимание тот факт, что при действии CBR-384 одновременно наблюдается увеличение числа клеток, потерявших мембранный потенциал, и значительное снижение дыхательной активности (Рис.17).

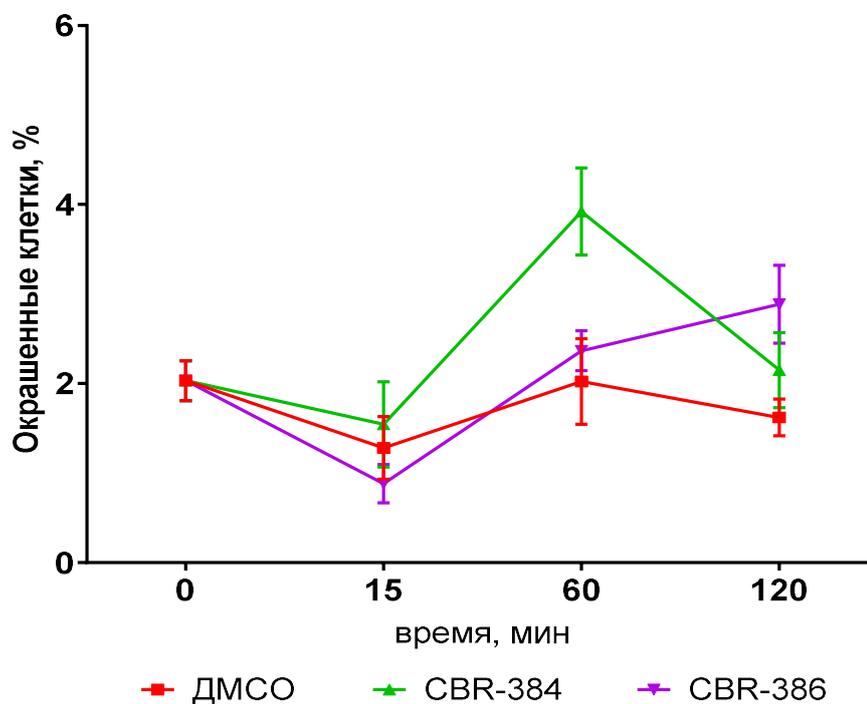


Рисунок 18 – Изменение доли клеток *E. coli* BW25113, окрашенных DiBAC4(3), от общего числа клеток при действии исследуемых веществ.

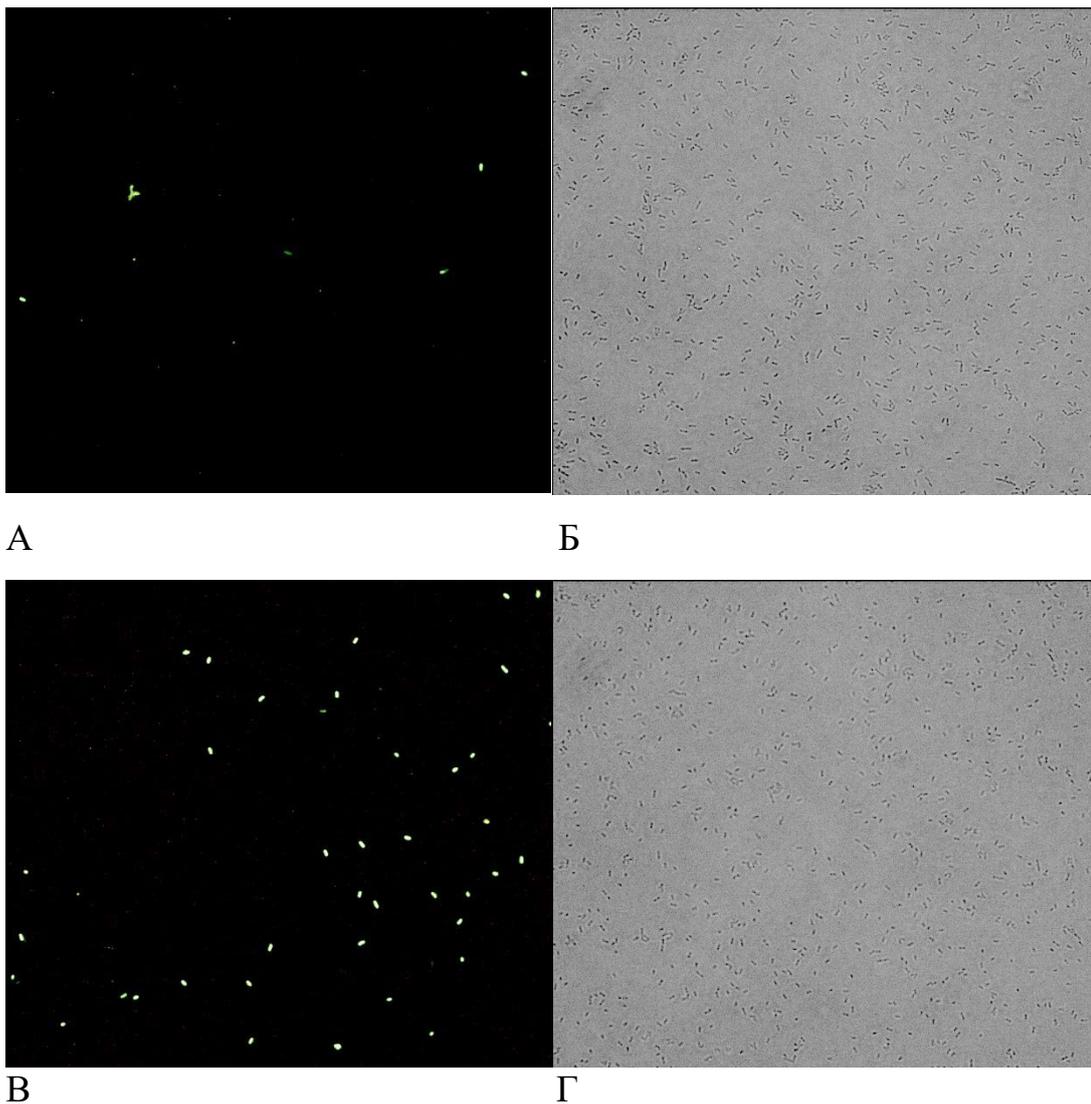


Рисунок 19 – Изменение доли клеток *E. coli* BW25113, окрашенных DiBAC4(3), от общего числа клеток при действии CBR-386. А, Б – до внесения соединения CBR-386, В, Г – через 120 минут после внесения CBR-386.

6.3. Рост мутантных штаммов с делециями по компонентам дыхательной цепи при воздействии на них CBR-384 и CBR-386

Ранее было обнаружено, что обработка *Mycobacterium tuberculosis* веществами, подобными CBR-384, снижает активность фермента MenB, участвующего в синтезе менахинона, одного из компонентов дыхательной цепи,

что позволяет рассматривать эти вещества как перспективные противотуберкулезные препараты.

Нами 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 другому компоненту дыхательной цепи, убихинону (*ubiC*). 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*) (Рис. 20). В этих же условиях, у *E. coli* JW5713 (*ubiC*) начальная скорость роста и OD₆₀₀ к концу культивирования были примерно на 30% ниже, чем у родительского штамма (Рис. 20, 21). При действии CBR-384 и CBR-386, наличие мутации *ubiC* снижало степень ингибирования роста по сравнению с родительским штаммом (Рис. 20, 21). Это может быть следствием более низкой скорости роста мутанта *ubiC* в момент воздействия исследуемых веществ. Влияние скорости роста бактерий на токсичность разного рода антимикробных веществ хорошо известно.

Ранее в Лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН было показано, что в отсутствие каких-либо воздействий и в условиях, аналогичных тем, в которых выращивались бактерии *E. coli* в настоящей работе, дыхательная активность мутанта *ubiC* была в 1.6 раза меньше, чем у родительского штамма, а у *menA* была такой же, как у родителя (Smirnova et al., 2020). Эти данные указывают на наличие связи между скоростью роста и активностью дыхания мутанта *ubiC*.

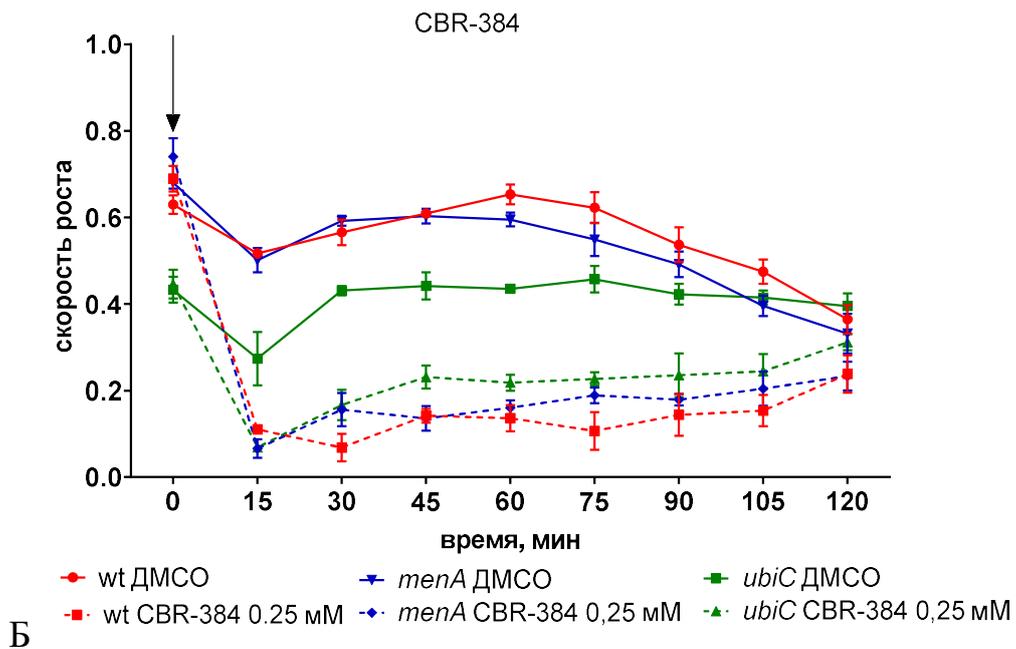
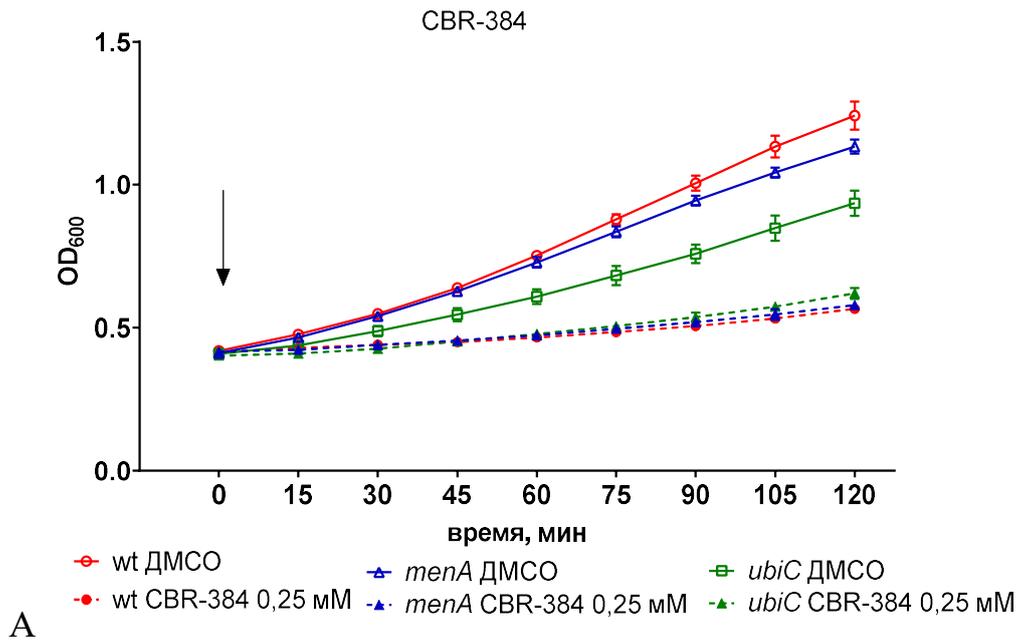


Рисунок 20 – Влияние мутаций *menA* и *ubiC* на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) при действии CBR-384 на растущие *E. coli*.

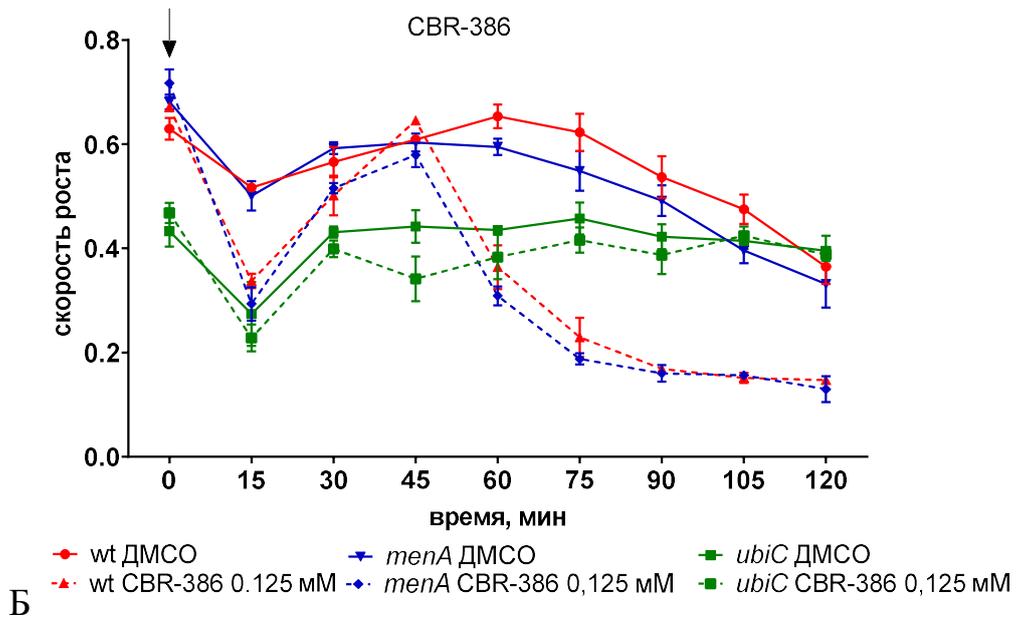
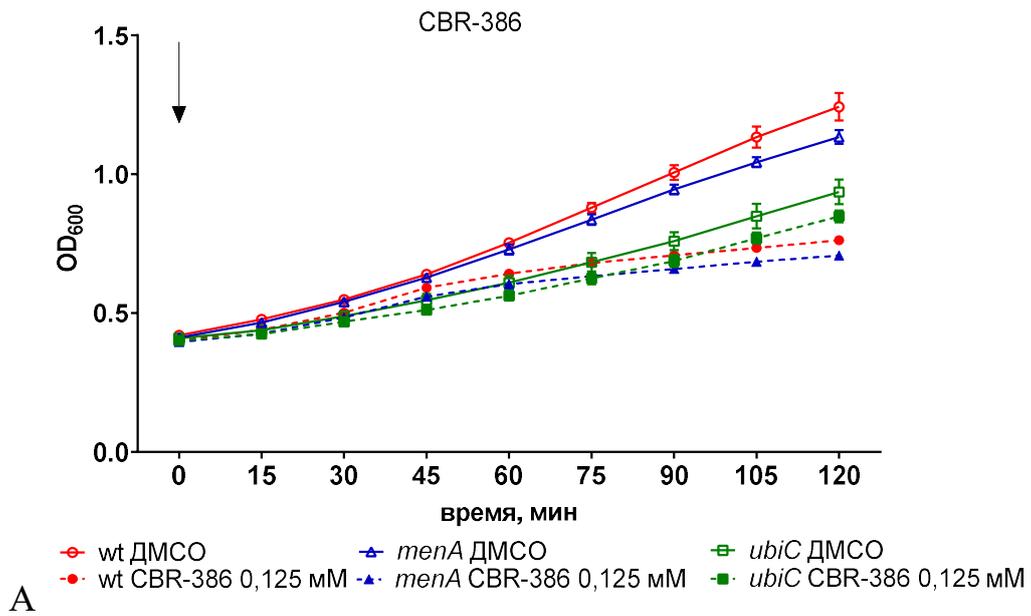


Рисунок 21 – Влияние мутаций *menA* и *ubiC* на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) при действии CBR-386 на растущие *E. coli*.

6.4. Рост мутантных штаммов с делециями по АТФазе при воздействии на них CBR-384 и CBR-386

В культурах, необработанных испытуемыми веществами (контроль), наличие мутаций *atpA*, *atpB*, *atpC* и *atpE* снижало накопление биомассы на 20-30%. Отмечено также снижение скорости роста, особенно заметное в начале и середине периода инкубации и более выраженный двухфазный профиль изменений скорости роста. Обработка CBR-384 и CBR-386 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, примерно в 2 раза ($P < 0,05$). Этот эффект может быть связан с более низкой скоростью роста данных мутантов в момент воздействия CBR-384 (Рис. 22, 23). При действии CBR-386 не выявлено достоверной разницы в изменении ростовых параметров у родительского штамма и мутантов (Рис. 24, 25).

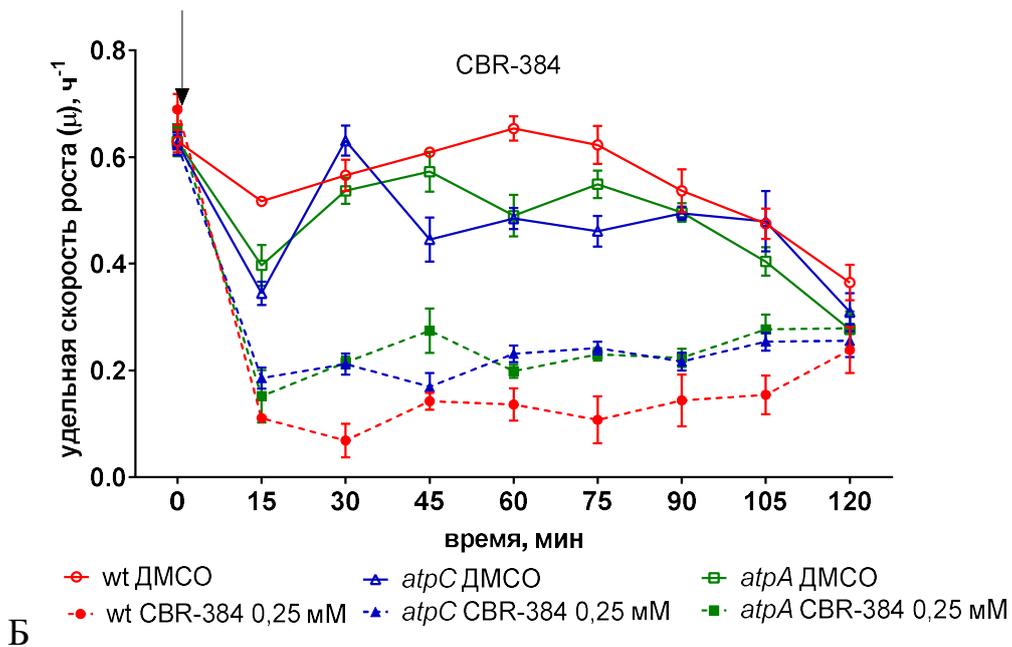
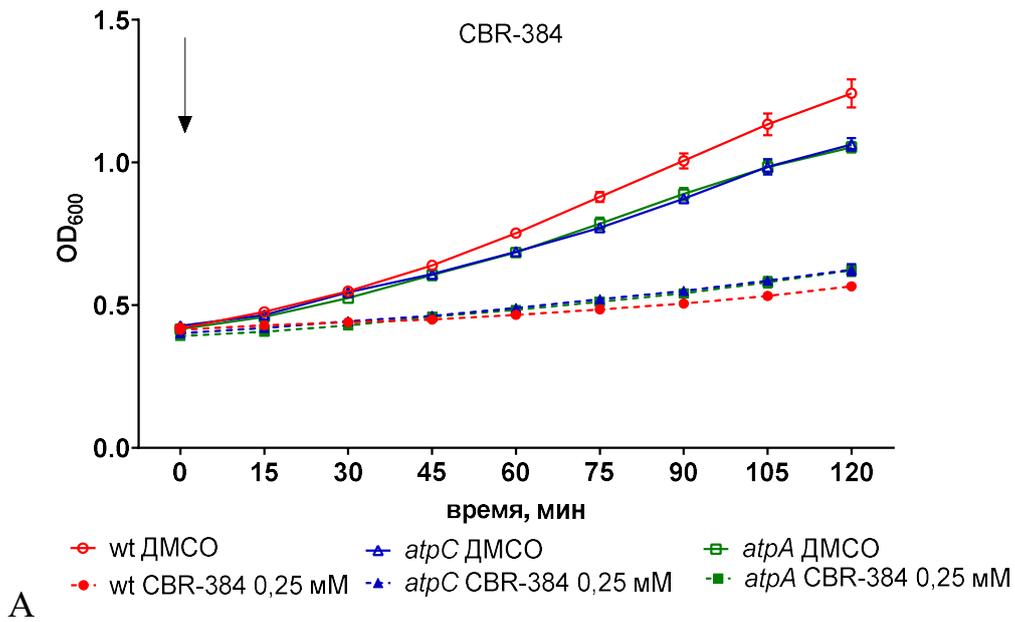


Рисунок 22 – Влияние мутаций *atpA* и *atpC* на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) при действии CBR-384 на растущие *E. coli*. Стрелки показывают момент добавления вещества.

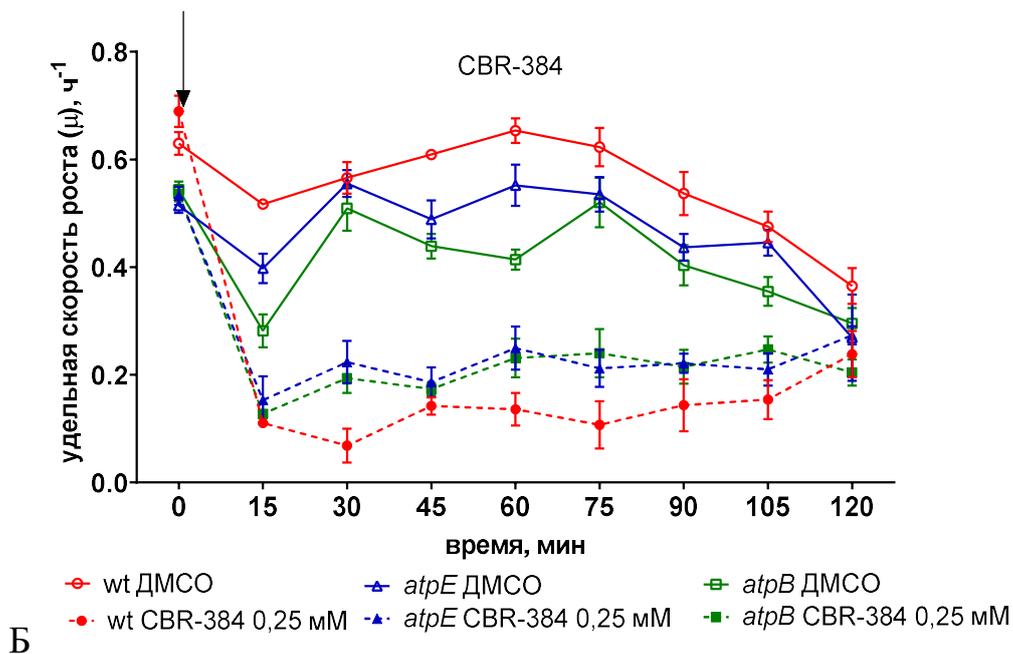
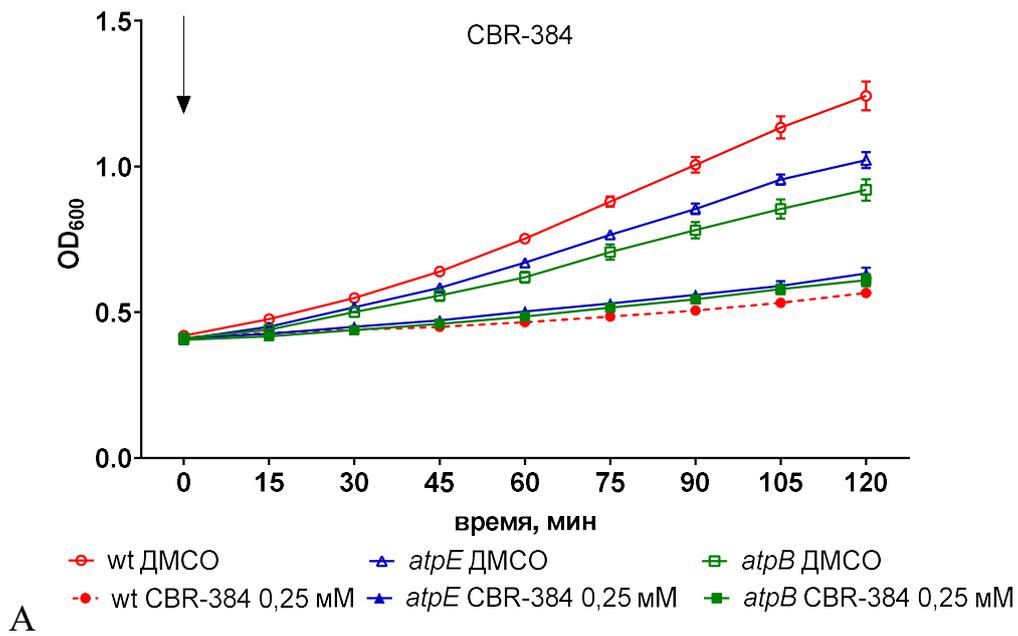


Рисунок 23 – Влияние мутаций *atpE* и *atpV* на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) при действии CBR-384 на растущие *E. coli*. Стрелки показывают момент добавления вещества.

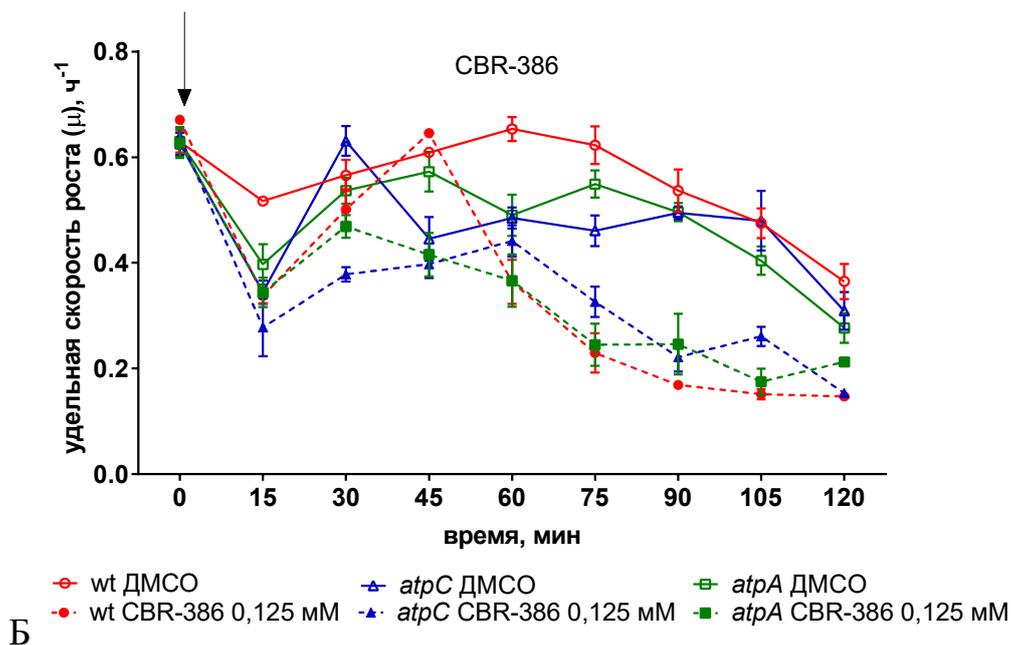
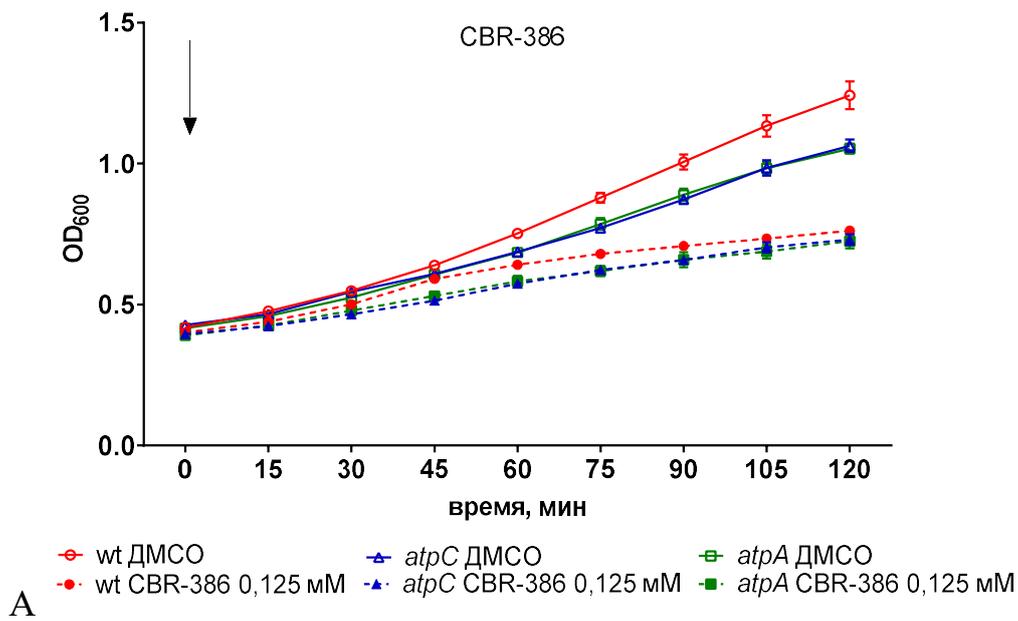


Рисунок 24 – Влияние мутаций *atpA* и *atpC* на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) при действии CBR-386 на растущие *E. coli*. Стрелки показывают момент добавления вещества.

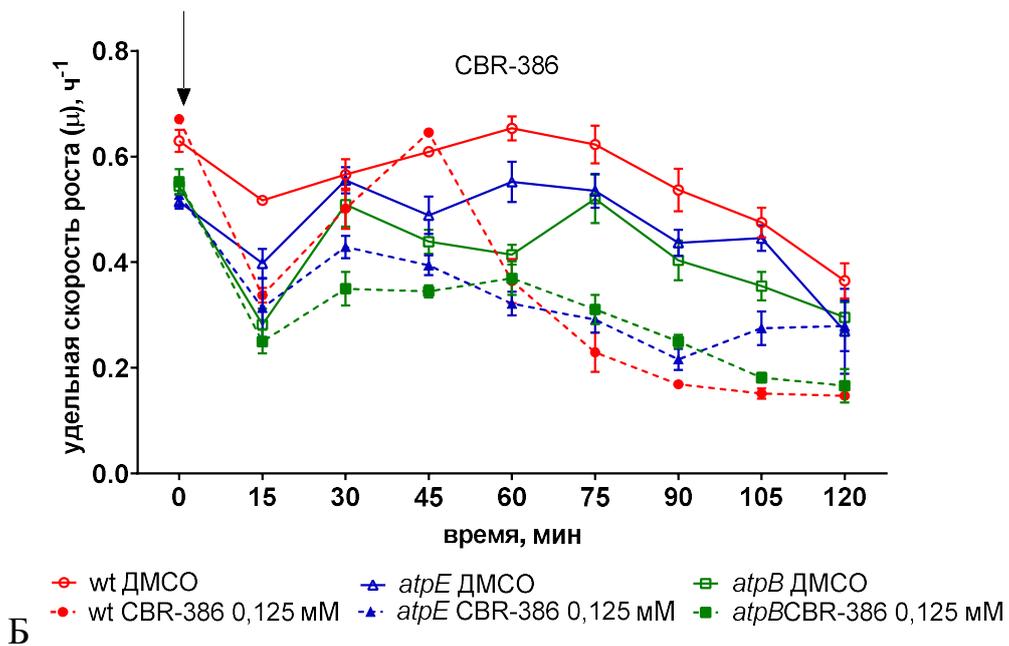
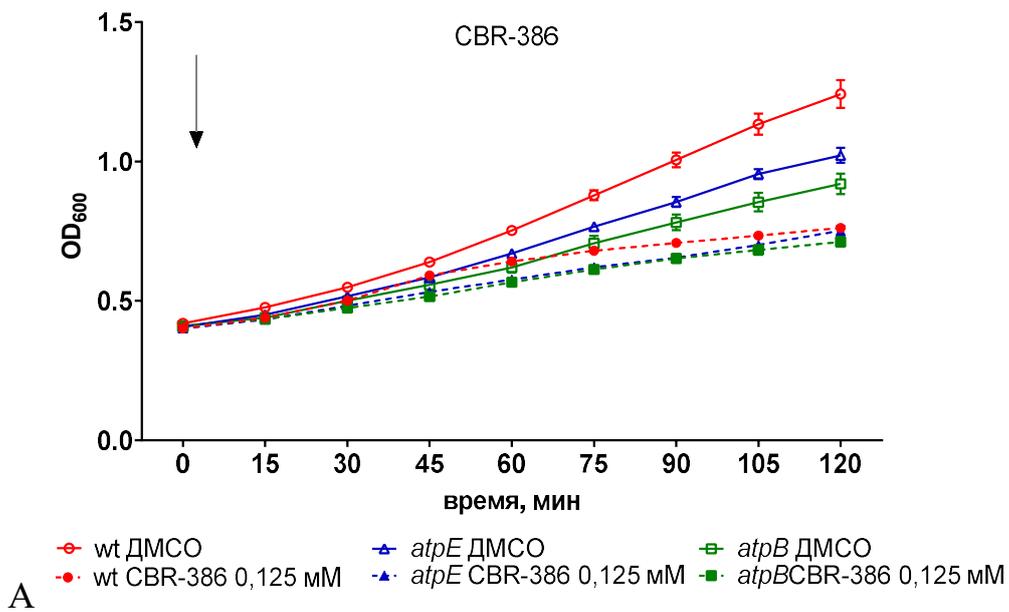


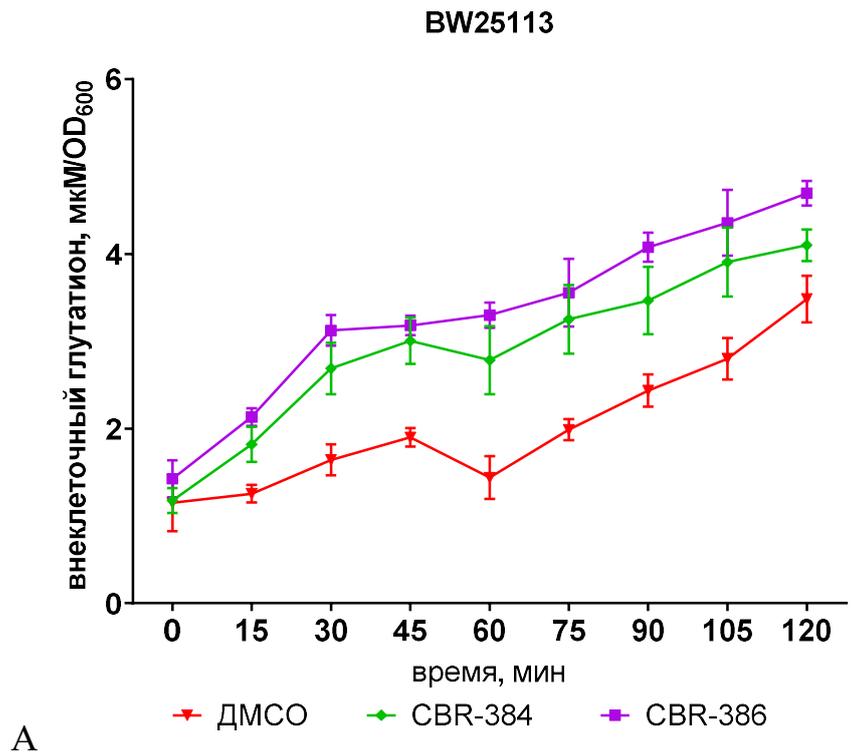
Рисунок 25 – Влияние мутаций *atpE* и *atDC* на накопление биомассы (А) и удельную скорость роста (Б) при действии CBR-386 на растущие *E. coli*. Стрелки показывают момент добавления вещества.

6.5. Влияние CBR-384 и CBR-386 на уровень внеклеточного глутатиона и сульфидов

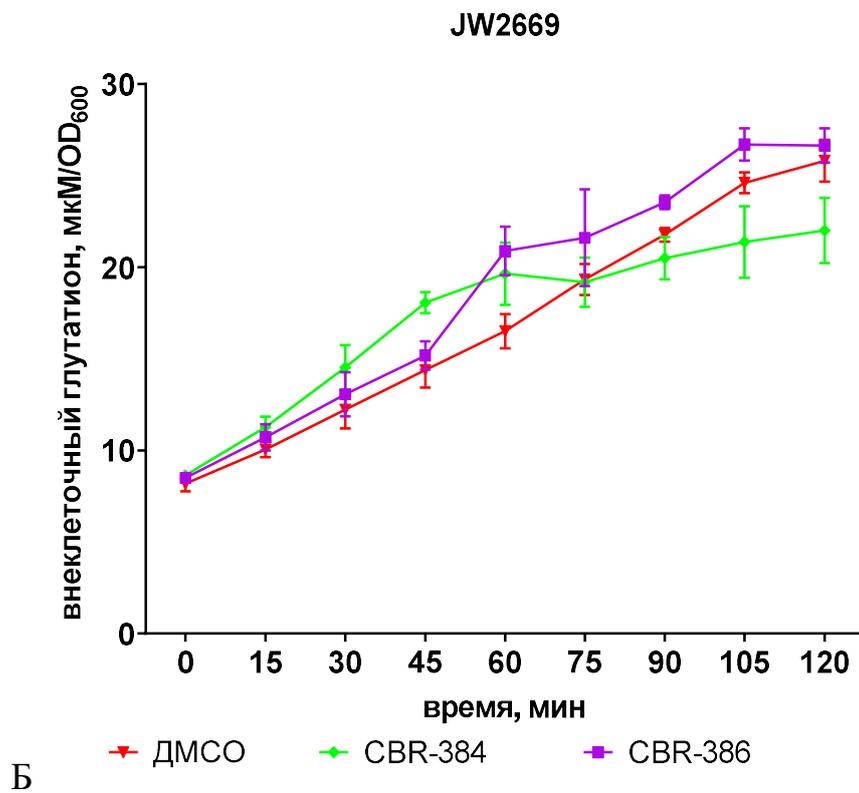
У *E. coli*, как и у других грамотрицательных бактерий, глутатион (GSH) выполняет роль главного редокс-буфера. Было показано, что при некоторых стрессовых воздействиях, сопровождающихся ингибированием роста, в культурах *E. coli* наблюдается значительное повышение внутри- и внеклеточного глутатиона (Smirnova et al., 2015). Представляло интерес проверить этот эффект при действии CBR-384 и CBR-386.

Исследование 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 ($P < 0,05$), но не на мутант JW2669 (рис 26). Наибольшее увеличение внеклеточного глутатиона по сравнению с контролем наблюдалось в фазе быстрого ингибирования роста (Глава 4.1).



А



Б

Рисунок 26 – Уровень внеклеточного глутатиона при действии CBR-384 и CBR-386 на штаммы *E. coli* BW25113 (А) и JW2669 (Б).

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* BW2511 наблюдалось значительное изменение потенциала сульфид-специфичного электрода, свидетельствующее об увеличении уровня внеклеточного сульфида, и совпадающее по времени с моментом снижения скорости роста (Глава 4.1). Согласно показаниям электрода, примерно через 30 минут после добавления CBR-384 уровень сульфида снижался до контрольного значения (Рис. 27).

При действии CBR-386 наблюдался значительно меньший двухфазный выброс сульфида, чем при действии CBR-384, что соответствовало более низкому бактериостатическому действию первого вещества (Рис. 27).

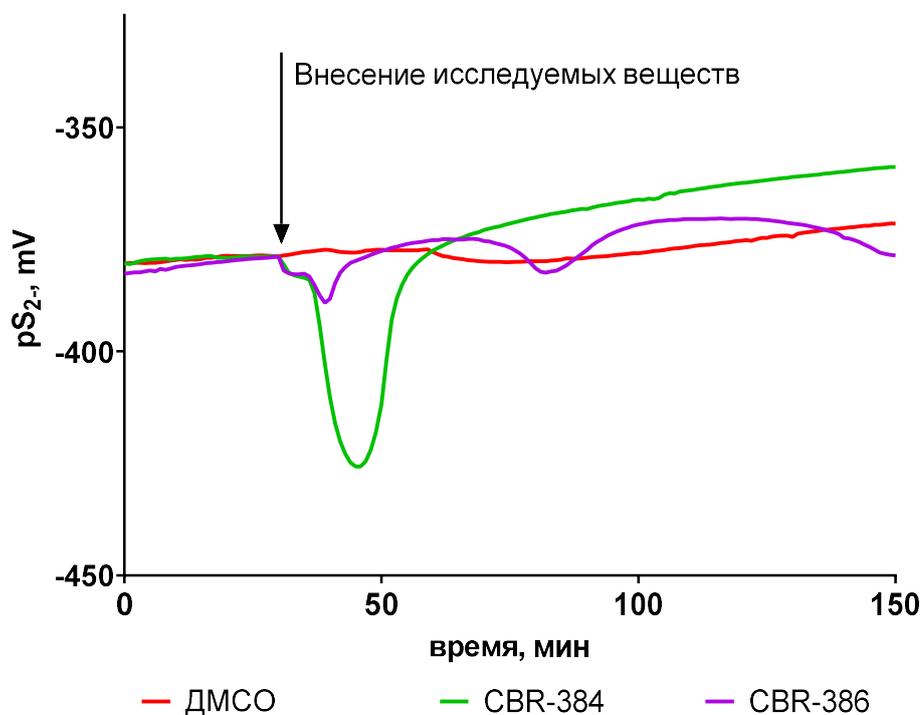


Рисунок 27 – Влияние CBR-384 и CBR-386 на концентрацию экстраклеточного сульфид-иона в растущей культуре *E. coli* BW25113.

ГЛАВА 7. 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, относящихся к разным классам оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов. 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 (Глава 4.2). 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 (рис. 28). Большинство бактерий микробиомных сообществ ЖКТ крыс принадлежали к филумам *Firmicutes* (57%), *Verrucomicrobiota* (23%) и *Actinobacteriota* (9%). Среди бактерий филума *Firmicutes* большинство бактерий относились к классам *Clostridia* (80%) и *Bacilli* (18%). Филлум *Verrucomicrobiota* был представлен классом *Verrucomicrobiae*, филлум *Actinobacteriota* классом *Coriobacteriia*.

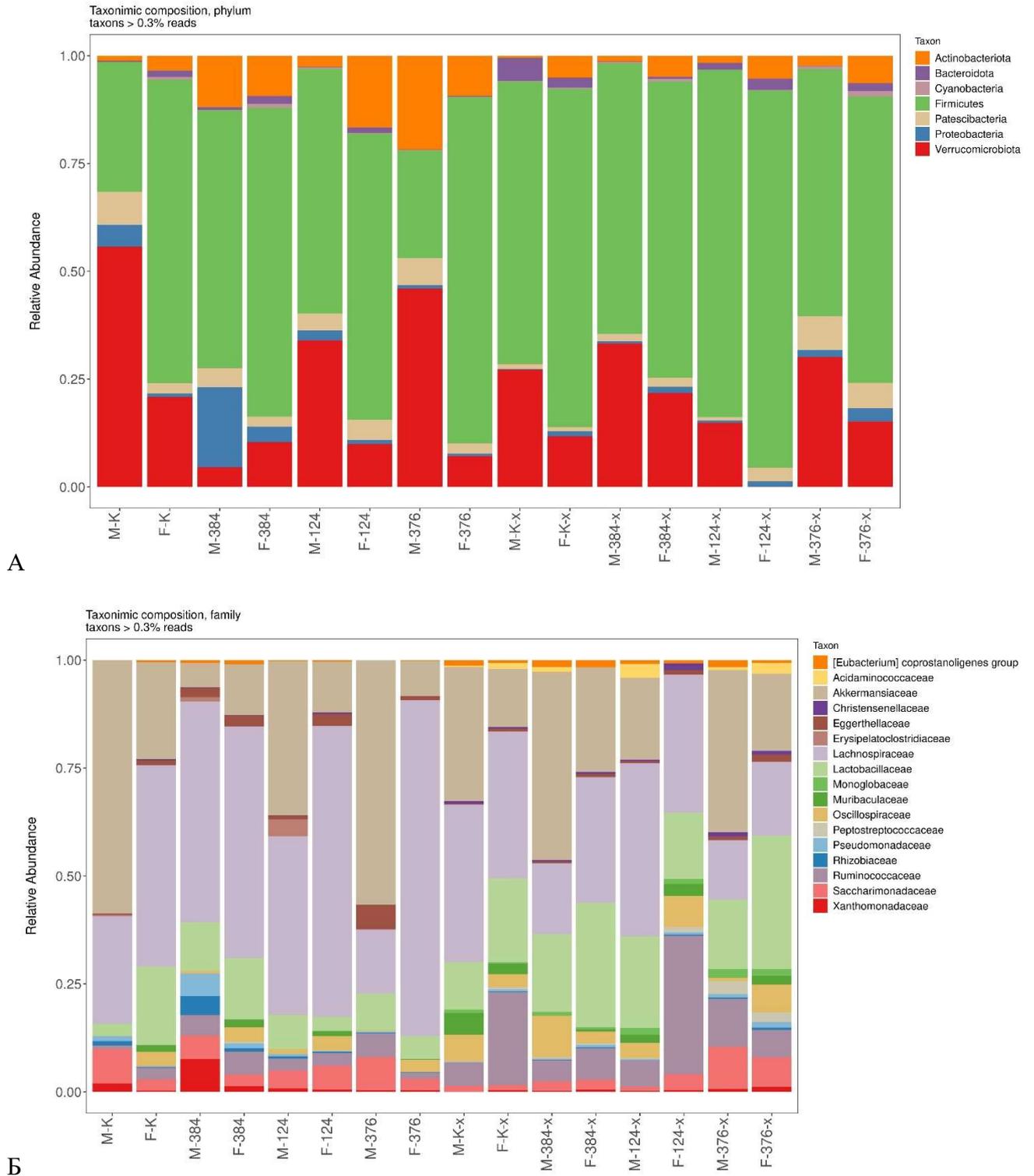


Рисунок 28 – Относительная представленность бактерий микробиома кишечника крыс на различных таксономических уровнях. А – на уровне филумов, Б – на уровне семейств. F/M – пол животных, К/384/124/376 – опытная группа животных, х – после введения веществ.

После двухнедельного введения крахмальной слизи наблюдалось значимое изменение состава микробиомов даже на уровне филумов во всех группах (Приложение А). Так, в контрольной группе, получавшей крахмальную слизь, достоверно уменьшилось количество представителей филума *Patescibacteria* в 4,7 раза за счет бактерий рода *Candidatus saccharimonas*. Представители данного филума являются в основном обитателями грунтовых вод и озер (Tian et al., 2020). Однако, бактерии порядка *Saccharimonadales* были обнаружены в ротовой полости человека, кишечнике и на кожных покровах, а их присутствие коррелировало с воспалительными заболеваниями слизистых покровов (Gómez-Valdez et al., 2021). Кроме того, у 5 из 6 животных, как минимум в 2 раза, наблюдалось уменьшение количества бактерий вида *Akkermansia muciniphila*, относящихся к семейству *Akkermansiaceae* филума *Verrucomicrobia* (рис. 29). *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*. Примечательно, что бактерии отрядов *Clostridia UCG-014* и *Monoglobales* не обнаружены в образцах, взятых до введения крахмальной слизи. Эти бактерии принадлежат к очень широкому и гетерогенному классу, среди которых есть патогенные виды, а также бактерии, продуцирующие полезные короткоцепочечные жирные кислоты. Роль отряда *Clostridia UCG-014* пока недостаточно изучена, однако результаты секвенирования показывают, что данные бактерии часто встречаются в микробиомном сообществе кишечника человека. *Oscillospirales* также, судя по всему, являются представителями нормальной микрофлоры кишечника, а их количество напрямую коррелирует с отсутствием у человека проблем с избыточным весом и нормальным уровнем холестерина в

крови. Сами бактерии являются продуцентами короткоцепочечных жирных кислот, например, бутирата и рассматриваются в качестве пробиотиков (Yang et al., 2021).

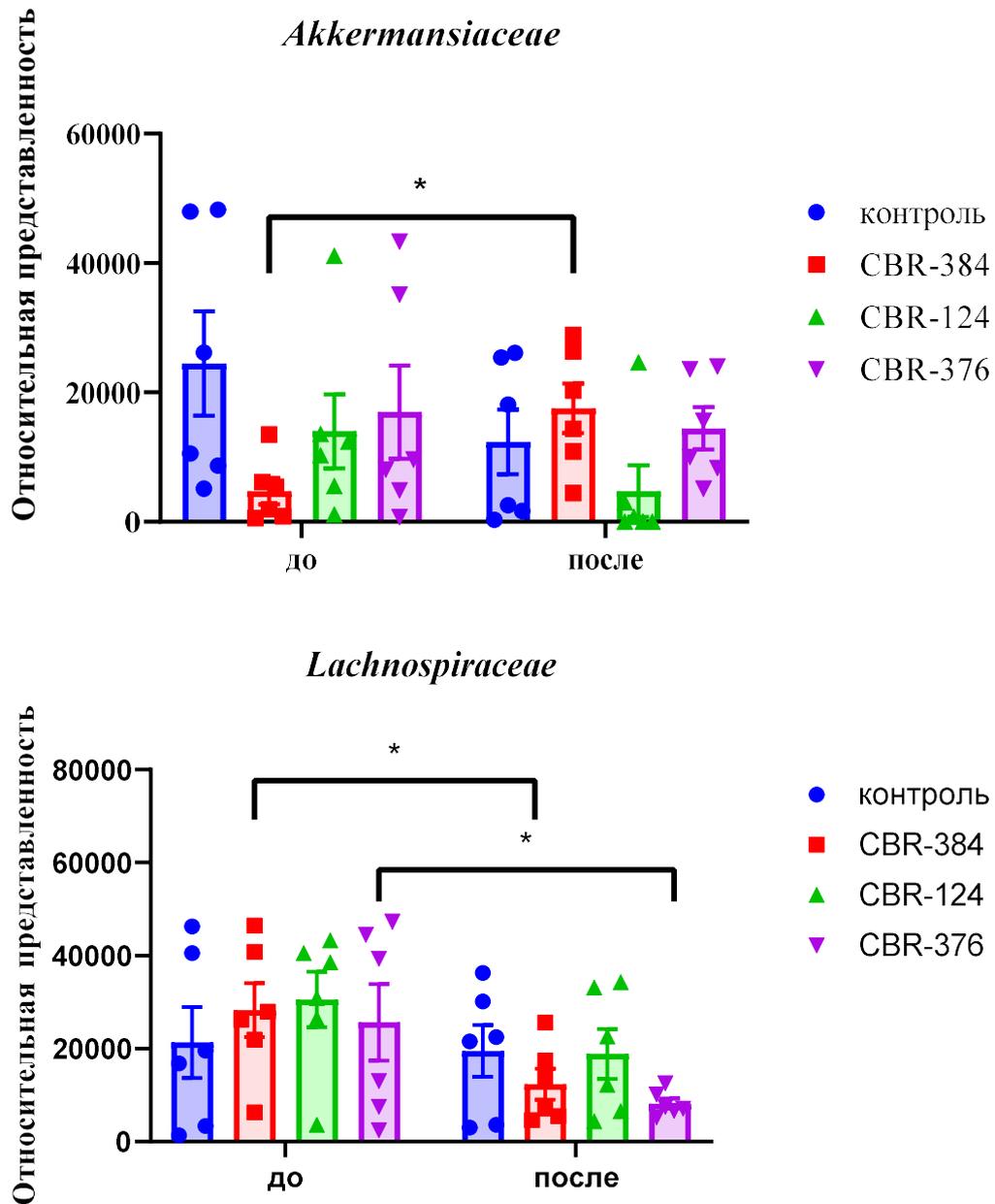


Рисунок 29 – Количество бактерий семейств *Akkermansiaceae* и *Lachnospiraceae* в микробиоме кишечника крыс до и после введения исследуемых веществ.

* - значения достоверно отличаются ($p < 0,05$).

Соединение CBR-384 наибольшее влияние оказало на бактерии вида *Akkermansia muciniphila*, семейства *Akkermansiaceae*, - их количество увеличилось в 3,6 раза (рис. 29, Приложение А). При этом в контрольной группе мы наблюдали противоположную тенденцию. Как и при введении крахмальной слизи, более чем в 100 раз увеличилось количество бактерий отряда *Clostridia UCG-014*. 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. Класс *Alphaproteobacteria* в основном был представлен семействами *Rhizobiaceae* и *Caulobacterales*. Большинство представителей *Rhizobiaceae* относятся к симбионтам растений, способным связывать азот. Однако, они встречаются и в кишечнике крыс (Liu et al., 2018). Члены семейства *Caulobacterales* были выделены из пресной воды, почвы, морской воды, растений, животных и человека. Некоторые виды данного семейства являются патогенными (Abraham et al., 2014). Снижение количества представителей класса *Gammaproteobacteria* произошло за счет семейств *Xanthomonadaceae* (в 12 раз), *Enterobacteriales* (в 7 раз) и *Pseudomonadaceae* (в 11 раз). Бактерия *Stenotrophomonas maltophilia*, относящаяся к классу *Xanthomonadaceae*, встречается во многих местах обитания. Она представляет серьезную опасность для людей с иммунодефицитом, так как обладает множественной устойчивостью к антибиотикам и все чаще колонизирует катетеры и протезы (An & Berg, 2018). В результате воздействия CBR-384 наблюдалось снижение количества *S. maltophilia* в 12 раз. Также данное вещество способствовало уменьшению в 10 раз количества другого патогена – представителя рода *Shigella*, относящегося к классу *Enterobacteriales*. Кроме патогенов, CBR-384 вызвал уменьшение количества некоторых бактерий – представителей нормальной

микробиоты кишечника. Так, в 4 раза снизилось количество бактерий, относящихся к семейству *Eggerthellaceae* класса *Coriobacteriia*. Бактерии данного семейства более характерны для микробиоты кишечника грызунов (Hoyles, 2019). Известно, что некоторые представители *Eggerthellaceae* способны метаболизировать изофлавоны (Soukup et al., 2021). Другие бактерии, представители нормальной микробиоты кишечника, количество которых уменьшилось в 2,3 раза, относятся к семейству *Lachnospirales* класса *Clostridia*. Представители данного семейства являются облигатными анаэробами и способны метаболизировать различные растительные полисахариды до короткоцепочечных жирных кислот и спиртов. Несмотря на способность бактерий продуцировать полезные для человека метаболиты, накапливаются данные о взаимосвязи этих бактерий с ожирением, болезнями печени и диабетом (Vacca et al., 2020).

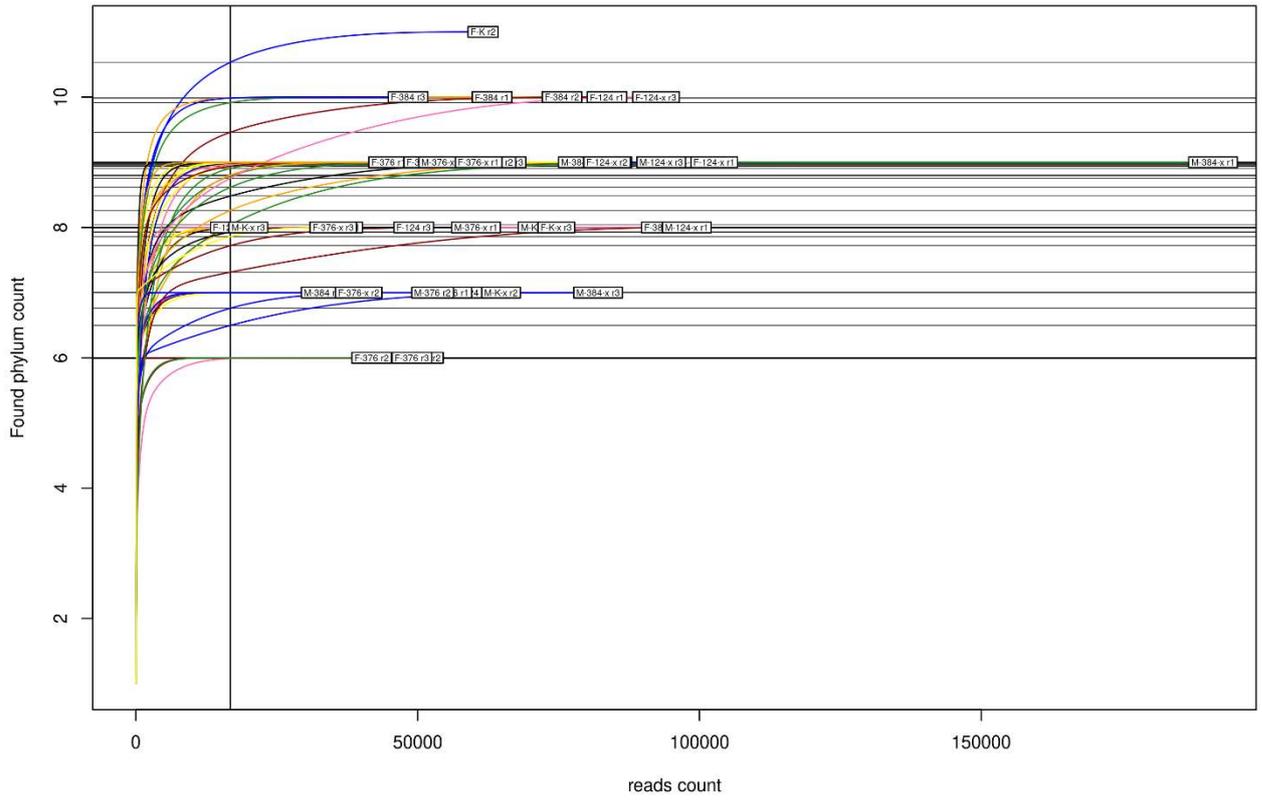
В группе животных, получавших соединение CBR-124, относящееся к третьему классу исследуемых веществ, в основном наблюдались те же изменения микробиотного состава, что и в контрольной группе. Уменьшалось количество бактерий филумов *Patescibacteria* и *Verrucomicrobia* в основном за счет бактерий рода *Candidatus Saccharimonas* в первом случае и бактерий вида *Akkermansia muciniphila* во втором случае. При этом увеличивалось количество бактерий класса *Clostridia*. Также наблюдалось увеличение в 3 раза количества бактерий семейства *Lactobacillaceae* класса *Bacilli* (Приложение А).

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 (рис. 29, Приложение 1). Как отмечалось ранее, увеличение соотношения *Akkermansia* / *Lachnospiraceae* рассматривается как положительное изменение микробиотного состава (Chen et al., 2023). Как и в контрольной группе сохранилось увеличение количества бактерий класса *Clostridia* за счет представителей отрядов *Clostridia* UCG-014, *Oscillospirales*, *Monoglobales*. Также под действием данного вещества произошло

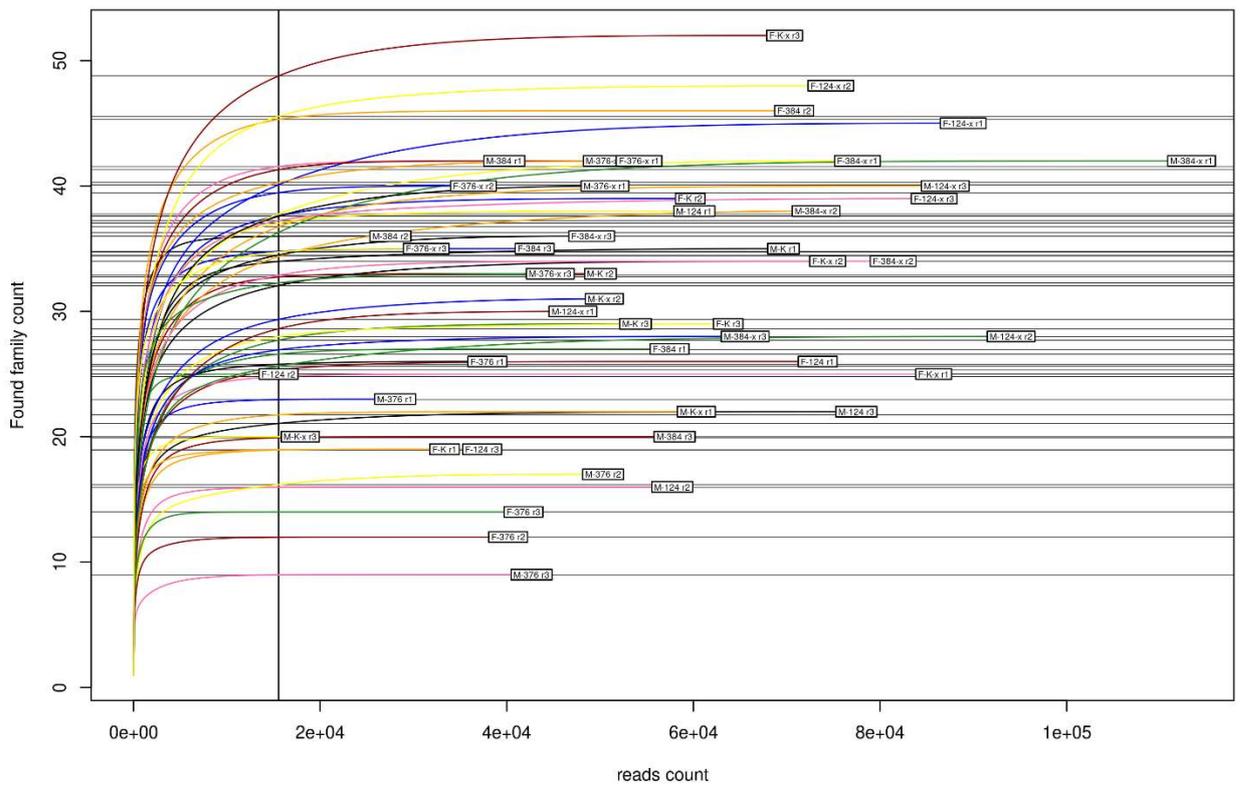
увеличение количества бактерий рода *Lactobacillus* в 10 раз и бактерий класса *Vampirivibrionia* в 5 раз. Представители филума *Cyanobacteria*, а конкретно класса *Vampirivibrionia*, являются единственными нефотосинтезирующими цианобактериями, обнаруженными в ЖКТ человека. Несмотря на большое количество исследований взаимосвязи количества этих бактерий с различными заболеваниями человека, достоверных сведений о положительной либо отрицательной роли нет (Hoyles, 2019). В группе CBR-376 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.

Для оценки α -разнообразия сообществ используют ряд индексов. Индексы Chao1 и ACE – отражают видовое разнообразие и позволяют оценить количество отдельных видов в образце. Индекс Шеннона характеризует как разнообразие, так и выравненность сообщества. Индекс Симпсона отражает наличие доминирующих таксонов в сообществе. По мере увеличения индекса Симпсона разнообразие в сообществе уменьшается. Для оценки биоразнообразия микробиомных сообществ кишечника крыс были рассчитаны индексы биоразнообразия Шеннона, Симпсона, Chao1 и ACE на уровнях филумов и семейств (Приложение Б).

Анализ кривых разрежения показал, что все образцы были секвенированы до насыщения (рис. 30).



А



Б

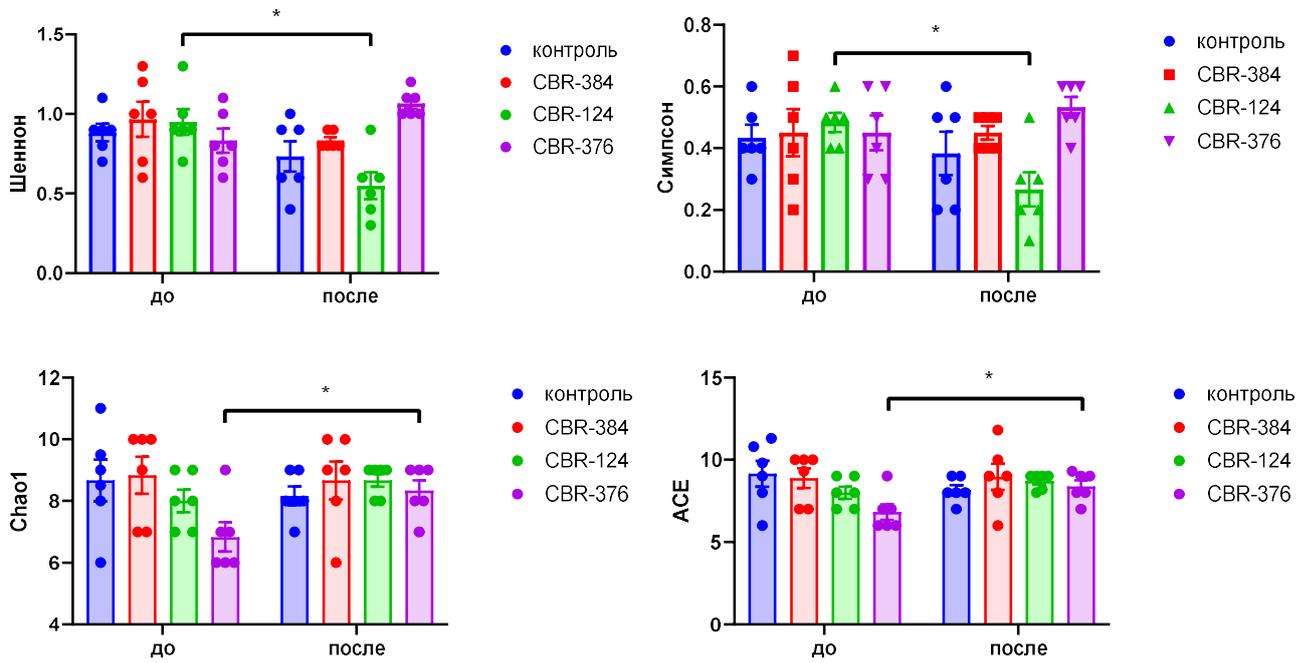
Рисунок 30 – Кривые разрежения для исследуемых проб на уровне филумов (А) и семейств (Б).

Индекс Шеннона варьировал от 0,3 до 1,3 на уровне филумов и от 0,8 до 2,5 на уровне семейств (рис. 31), что говорит о невысоком биоразнообразии микробных сообществ в исследуемых образцах. Достоверное снижение на уровне филумов наблюдалось в группе вещества CBR-124, при этом на уровне семейств наблюдалось увеличение биоразнообразия в группах контроля и вещества CBR-376.

Средние значения индекса Симпсона для всех групп до начала эксперимента были близки к 0,4 на уровне филумов и 0,5 на уровне семейств. Наблюдалось достоверное снижение индекса Симпсона при воздействии на крыс веществом CBR-124 на уровне филумов, что говорит об уменьшении доминирования отдельных видов (рис. 31 А). Соединение CBR-376 вызывало увеличение индекса Симпсона на уровне семейств, характеризующееся дисбалансом в пользу численности небольшого количества видов (рис. 31 Б).

Индексы Chaol и ACE показали достоверное увеличение биоразнообразия сообществ на обоих таксономических уровнях под действием вещества CBR-376, а также на уровне семейств под действием CBR-124.

А



Б

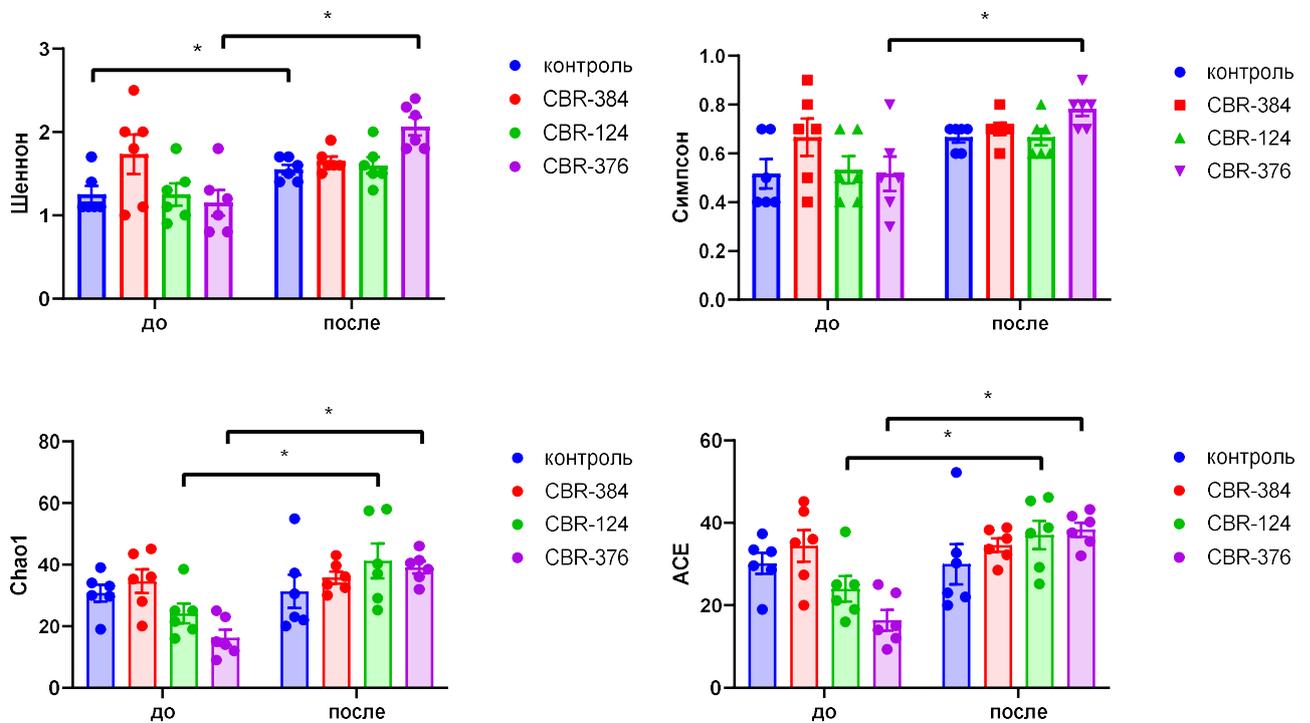


Рисунок 31 – Значения индексов биоразнообразия Шеннона, Симпсона, Chao1 и ACE для филумов (А) и семейств (Б).

* - значения достоверно отличаются ($p < 0,05$).

Таким образом, было установлено, что наибольшее влияние на α -разнообразие микробиомных сообществ кишечника крыс оказало соединение CBR-376, что характеризуется достоверным увеличением всех индексов на уровне семейств. Соединение CBR-384 не влияло на α -разнообразие сообществ.

Для оценки β -разнообразия между исследуемыми бактериальными сообществами были рассчитаны индексы Жаккарда и Брея-Кертиса на уровнях филумов и семейств (рис. 32, Приложение В). Индекс Жаккара отражает факт встречаемости таксонов в двух сообществах, тогда как индекс Брея-Кертиса позволяет учитывать количественные соотношения между ними.

Индекс Жаккара варьировал от 0,1 до 0,8 на уровне филумов и от 0,3 до 0,9 на уровне семейств (рис. 32). На уровне филумов среднее для всех групп было близко к 0,45, на уровне семейств – 0,65. Индекс Брея-Кертиса принимал значения от 0,1 до 0,7 на уровне филумов при среднем, близком к 0,3 для всех групп, и от 0,2 до 0,8 на уровне семейств при среднем около 0,5. Таким образом, наблюдалась широкая вариабельность в β -разнообразии между сообществами микробиома кишечника крыс до и после проведения эксперимента независимо от вводимого вещества.

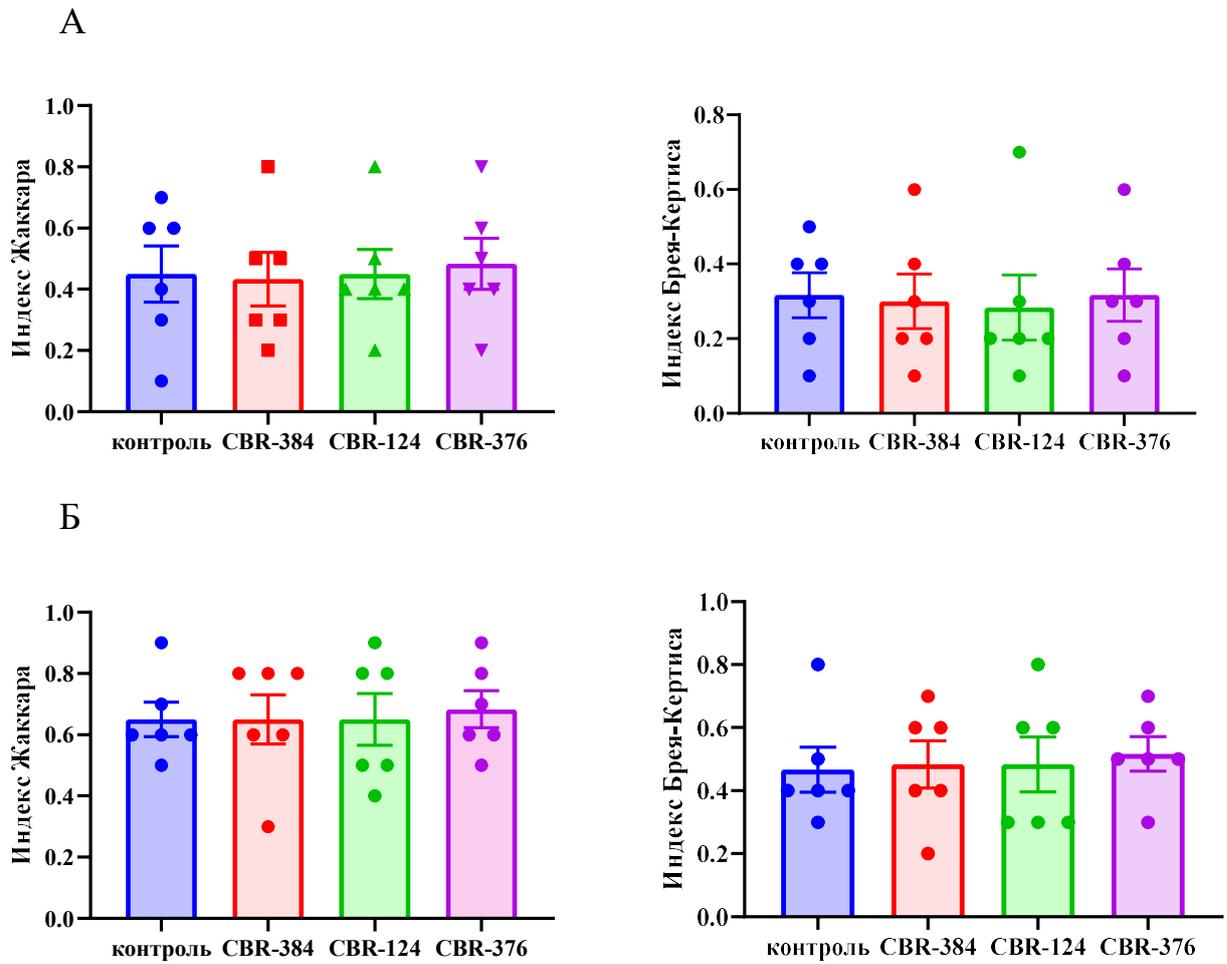


Рисунок 32 – Индексы Жаккара и Брея-Кертиса сообществ микробиома кишечника крыс до и после введения исследуемых веществ на уровне филумов (А) и семейств (Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для химических соединений, 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 лекарственные препараты.

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 для 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.

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 (СВР-371) значительно снижало накопление биомассы, скорость роста и значение КОЕ. Второе (СВР-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* BW25113 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 лекарственные препараты (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. Существенное отличие между условиями в колбах и планшетах состояло в том, что 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 микроаэробных 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 другому компоненту дыхательной цепи 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. Влияние скорости роста бактерий на токсичность разного рода антимикробных веществ хорошо известно.

Ранее в Лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов (ЛФГМ) ИЭГМ УрО РАН было показано, что в отсутствие каких-либо воздействий и в условиях аналогичным тем, в которых выращивались бактерии *E. coli* в настоящей работе, дыхательная активность мутанта *ubiC* была в 1.6 раза меньше, чем у родительского штамма, а у *menA* была такой же, как у родителя (Smirnova et al., 2020). Эти данные указывают на наличие связи между скоростью роста и активностью дыхания мутанта *ubiC*. В целом, мы не получили достаточных доказательств того, что бактериостатическое действие CBR-384 может быть связано с его влиянием на дыхательную систему *E. coli*.

Ранее в ЛФГМ было показано, что ингибирование роста *E. coli* при голодании по глюкозе, азоту и фосфору, а также при действии ряда антибиотиков 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.

В нашей работе установлено, что исследованные ОАГ не вызывают прооксидантного, а также генотоксического действия. Учитывая планируемое предназначение ОАГ, можно рассматривать это как положительное свойства, гарантирующие отсутствие таких отрицательных отдаленных последствий, связанных с мутагенезом и канцерогенезом. С другой стороны, известно, что продукция оксидантов рядом симбионтов способствует ингибированию роста патогенов.

Особый интерес представляют результаты исследования действия ОАГ на микробиом лабораторных крыс. Нами впервые показано влияние трех ОАГ на микробиомный состав кишечника крыс. Наибольший интерес вызывает увеличение количества бактерий рода *Akkermansia* и уменьшение количества патогенных бактерий родов *Shigella* и *Stenotrophomonas* под действием CBR-384.

В настоящее время, не вызывает сомнения влияние микробиома на все аспекты здоровья человека. Необходимо накопление данных о роли различных факторов, в том числе, влиянии лекарственных препаратов, на активность микробиома.

Дальнейшая разработка темы может иметь несколько направлений:

- Расширение пула исследуемых веществ за счет введения в изученные структуры новых радикалов и исследование их влияния на сочетание биологических активностей;
- Создание на основе наиболее активных изученных веществ пролекарств и дальнейшее проведение для них доклинических исследований;
- Определение механизма бактериостатического действия ряда соединений;
- Исследование влияния соединения CBR-384 на рост изолятов бактерий видов *Akkermansia muciniphila* и *Stenotrophomonas maltophilia*.

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 (СВР-371 и СВР-384), обладающие наибольшей бактериостатической активностью. Эти два соединения, а также соединения СВР-124 и СВР-386, способны снижать биопленкообразование бактерий *E. coli*.

4. Соединения СВР-384 и СВР-386 способны ингибировать дыхательную активность и снижать мембранный потенциал клеток бактерий *E. coli*.

5. Ингибирование роста *E. coli* при действии СВР-384 и СВР-386 сопровождается увеличением уровня внеклеточного глутатиона и вытеканием сульфида при действии СВР-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 действие на микробиом кишечника лабораторных животных.

7. СВР-384 оказывает влияние на микробиомный состав кишечника крыс: вещество вызывает увеличение количества бактерий рода *Akkermansia* и снижение количества представителей родов *Shigella* и *Stenotrophomonas*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ДМСО – диметилсульфоксид

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ – колониеобразующая способность

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ОАГ - оксопроизводные азотсодержащих гетероциклов

ОБ – общее биопленкообразование

ОНФГ - *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид

РСА – радикалсвязывающая активность

УБ – удельное биопленкообразование

ЦНС – центральная нервная система

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭТЦ – электронно-транспортная цепь

ААРН – 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид

АВТС - 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота

ahpCF – алкилгидропероксидредуктаза

AR – краситель Amplex Red

AUC – площадь под кривой

CUPRAC - cupric ion reducing antioxidant capacity

DiBAC₄(3) - бис- (1,3-дибарбитуровая кислота)-триметиноксанол

DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

DTNB - 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)

FADH – флавинадениндинуклеотид

FRAP - ferric reducing antioxidant power

GPx8 - глутатионпероксидаза 8

GSH –глутатион

НАТ - перенос атома водорода

НPI и НPII – каталазы-гидропероксидазы

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-PT - перенос одного электрона с последующим переносом протона

SOD – супероксиддисмутаза

SPLET - последовательный перенос электронов с потерей протона

TOAC - total antioxidant capacity

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова // *Обзоры По Клинической Фармакологии И Лекарственной Терапии*. – 2014. – Т. 12(4). – С. 13–21.
2. Октябрьский, О. Н. Роль тиоловых редокс-систем в отклике бактерий *Escherichia coli* на пероксидный стресс / О. Н. Октябрьский [и др.] // *Микробиология*. – 2007. – Т. 76(6). – С. 759–765
3. Смирнова Г.В. Глутатион у бактерий / Г.В. Смирнова, О. Н. Октябрьский // *Биохимия*. – 2005. – Т. 70(11). – С. 1459–1473.
4. Ткаченко, А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов / А.Г. Ткаченко // Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 268 с.
5. Abraham, W. R. The family *Caulobacteraceae* / W. R. Abraham, M. Rohde, A. Bennasar // *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* / Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. – P. 179-205.
6. Alam, M. N. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity / M. N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2013. – V. 21(2). - P. 143–152.
7. Aliev, Z. G. Reaction of 3 (Z) -benzoylmethylidene-6-nitro-3 , 4-dihydro-2 H -1 , 4- benzooxazin-2-one with oxalyl chloride / Z. G. Aliev [*et al.*] // *Russian Chemical Bulletin*. – 2000. – V. 49(12). – P. 2045–2047.
8. Alisi, I. O. Free radical scavenging mechanism of 1,3,4-oxadiazole derivatives: thermodynamics of O–H and N–H bond cleavage / I. O. Alisi, A. Uzairu, S. E. Abechi // *Heliyon*. – 2020. – V. 6(3). – № 03683.
9. Amaye, I. J. Enaminones as building blocks in drug development: Recent advances in their chemistry, synthesis, and biological properties / I. J. Amaye [*et al.*] // *Tetrahedron*. – 2021. – V. 83. – № 131984.

10. Ames, B. N., Durston, W. E., Lyaasaki, E., & Lee, D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection / B. N. Ames [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1973. – V. 70(8). – P. 2281–2285.
11. Ames, B. N. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens / B. N. Ames, F. D. Lee, W. E. Durston // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1973. – V.70 (3). – P. 782–786.
12. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations / J. M. Andrews // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2001. – V. 48. – P. 5–16.
13. An, S. *Stenotrophomonas maltophilia* / S. An, G. Berg // Trends in Microbiology. – 2018. – V. 26(7). – P. 637–638.
14. Aribisala, J. O. Redox impact on bacterial macromolecule: a promising avenue for discovery and development of novel antibacterials / J. O. Aribisala, S. Sabiu // Biomolecules. – 2022. – V. 12(11). – № 1545.
15. Barteková, M. Natural and synthetic antioxidants targeting cardiac oxidative stress and redox signaling in cardiometabolic diseases / M. Barteková [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2021. – V. 169. – P. 446–477.
16. Becattini, S. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease / S. Becattini, Y. Taur, E. Pamer // Trends Mol. Med. – 2016. – V. 22 (6). – P. 458–478.
17. Beloin, C. *Escherichia coli* biofilms / C. Beloin, A. Roux, J. M. Ghigo // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2008. – V. 322. – P. 249–289.
18. Bettenbrock, K. Towards a systems level understanding of the oxygen response of *Escherichia coli* / K. Bettenbrock [et al.] // Advances in Microbial Physiology. – 2014. – V. 64. – P. 65–114.
19. Blanco, M. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its *oxyR*⁺ parent WP2 *uvrA*/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens / M. Blanco, A. Martinez, A. Urios // Mutation Research. – 2000. – V. 467(1). – P. 41–53.

20. Blanco, M. New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens / M. Blanco, A. Urios, A. Martinez // *Mutation Research*. – 1998. – V. 413(2). – P. 95–101.
21. Borisov, V. B. ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria / V. B. Borisov [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – V. 10(6). – P. 1–17.
22. Boteva, A. A. Synthesis and analgesic activity of [b]-annelated 4-quinolones / A. A. Boteva [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – V. 53(7). – P. 616–619.
23. Brainina, K. Antioxidants: terminology, methods, and future considerations / K. Brainina, N. Stozhko, M. Vidrevich // *Antioxidants*. – 2019. – V. 8(8). – № 297.
24. Bridges, B. A. Mutagen screening by a simplified bacterial fluctuation test: use of microsomal preparations and whole liver cells for metabolic activation / B. A. Bridges [et al.] // *Mutation Research*. – 1977. – V. 48. – P. 287–293.
25. Burton, G. J. Oxidative stress / G. J. Burton, E. Jauniaux // *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. – 2011. – V. 25(3). – P. 287–299.
26. Cabiscol, E. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species / E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros // *International Microbiology*. – 2000. – V. 3(1). – P. 3–8.
27. Callaway, J. K. Incorporation of sodium channel blocking and free radical scavenging activities into a single drug, AM-36, results in profound inhibition of neuronal apoptosis / J. K. Callaway [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2001. – V. 132(8). – P. 1691–1698.
28. Čáp, M. Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities / M. Čáp, L. Váchová, Z. Palková // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2012. – V. 2012. – P. 1-17.
29. Carmel-harel, O. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress / O. Carmel-harel, G. Storz // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. – V. 54. – P. 439–461.

30. Ceylan, Ş. Antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities of novel quinolones / Ş. Ceylan [*et al.*] // *ChemistrySelect*. – 2020. – V. 5 (36). – P. 11340–11346.
31. Chandra, S. The gut microbiome in Alzheimer's disease: what we know and what remains to be explored / S. Chandra, S. S. Sisodia, R. J. Vassar // *Molecular Neurodegeneration*. – 2023. – V. 18(1). – P. 1–21.
32. Chen, J. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids / J. Chen [*et al.*] // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10(1). – P. 1–9.
33. Chen, P. C. The Alteration of *Akkermansiaceae/Lachnospiraceae* ratio is a microbial feature of antibiotic-induced microbiota remodeling / P. C. Chen [*et al.*] // *Bioinformatics and Biology Insights*. – 2023. – V. 17.
34. Cindrova-Davies, T. Pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction / T. Cindrova-Davies // *Placenta*. – 2009. – V. 23. – P. 55–65.
35. Clarke, G. Gut reactions: breaking down xenobiotic–microbiome interactions / G. Clarke [*et al.*] // *Pharmacological Reviews*. – 2019. – V. 71(2). – P. 198–224.
36. Collins, S. L. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism / S. L. Collins, A. D. Patterson // *Acta Pharmaceutica Sinica*. – 2020. – V. 10(1). – P. 19–32.
37. Cong, B. The impact on antioxidant enzyme activity and related gene expression following adult zebrafish (*Danio rerio*) exposure to dimethyl phthalate / B. Cong [*et al.*] // *Animals*. – 2020. – V. 10. – № 717.
38. Conway, T. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut / T. Conway, P. S. Cohen // *Microbiol Spectr*. – 2015. – V. 3(3).
39. Couto, N. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network / N. Couto, J. Wood, J. Barber // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – V. 95. – P. 27–42.

40. Cryan, J. F. The microbiota-gut-brain axis / J. F. Cryan [*et al.*] // *Physiological Reviews*. – 2019. – V. 99(4). – P. 1877–2013.
41. Dan Dunn, J. Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis / J. Dan Dunn [*et al.*] // *Redox Biology*. – 2015. – V. 6. – P. 472–485.
42. Dasari, T. P. Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co₃O₄ and TiO₂) to *E. coli* bacteria / T. P. Dasari, K. Pathakoti, H. M. Hwang // *Journal of Environmental Sciences*. – 2013. – V. 25(5). – P. 882–888.
43. D'Autréaux, B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis / B. D'Autréaux, M. B. Toledano // *Molecular Cell Biology*. – 2007. – V.8 (10). – P. 813–824.
44. Dedon, P. C. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation / P. C. Dedon, S. R. Tannenbaum // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2004. – V. 423(1). – P. 12–22.
45. De Filippis, F. Specific gut microbiome signatures and the associated pro-inflammatory functions are linked to pediatric allergy and acquisition of immune tolerance / F. De Filippis [*et al.*] // *Nature Communications*. – 2021. – V. 12(1). – № 5958
46. Deloménie, C. Identification and functional characterization of arylamine N-acetyltransferases in eubacteria: evidence for highly selective acetylation of 5-aminosalicylic acid / C. Deloménie [*et al.*] // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183(11). – P. 3417–3427.
47. De Luca, F. The microbiome in autoimmune diseases / F. De Luca, Y. Shoenfeld // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2019. – V. 195(1). – P. 74–85.
48. Demple, B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon - A review / B. Demple // *Gene*. – 1996. – V. 179(1). – P. 53–57.
49. Dempsey, J. L. Microbiome is a functional modifier of P450 drug metabolism / J. L. Dempsey, J. Y. Cui // *Current Pharmacology Reports*. – 2019. – V. 5(6). – P. 481–490.

50. Dempsey, J. L. Gut microbiome: an intermediary to neurotoxicity / J. L. Dempsey, M. Little, J. Y. Cui // *NeuroToxicology*. – 2019. – V. 75(3). – P. 41–69.
51. Derrien, M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions / M. Derrien, C. Belzer, W. M. de Vos // *Microbial Pathogenesis*. – 2017. – V.106. – P. 171–181.
52. de Torre, M. P. A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity *in vivo* / de M. P. Torre [et al.] // *Antioxidants*. – 2019. – V. 8(5). – P. 1–11.
53. Devillard, E. Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid / E. Devillard [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2007. – V. 189(6). – P. 2566–2570.
54. Dhopatkar, N. Gastrointestinal symptoms, gut microbiome, probiotics and prebiotics in anorexia nervosa: a review of mechanistic rationale and clinical evidence / N. Dhopatkar [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2023. – V. 147. – № 105959.
55. Dinis-Oliveira, R. J. Metabolic profile of oxazepam and related benzodiazepines: clinical and forensic aspects / R. J. Dinis-Oliveira // *Drug Metabolism Reviews*. – 2017. – V. 49(4). – P. 451–463.
56. Donoso, F. Inflammation, lifestyle factors, and the microbiome-gut-brain axis: relevance to depression and antidepressant action / F. Donoso [et al.] // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2023. – V. 113(2). – P. 246–259.
57. Dupré-Crochet, S. ROS production in phagocytes why when and where? / S. Dupré-Crochet, M. Erard, O. Nube // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2013. – V. 94. – P. 657–670.
58. Enright, E. F. The impact of the gut microbiota on drug metabolism and clinical outcome / E. F. Enright [et al.] // *Yale Journal of Biology and Medicine*. – 2016. – V. 89(3). – P.375–382.
59. Fenn, K. Quinones are growth factors for the human gut microbiota / K. Fenn [et al.] // *Microbiome*. – 2017. – V. 5(1). – № 161.

60. Fernandez-Panchon, M. S. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence / M. S. Fernandez-Panchon [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2008. – V. 48(7). – P. 649–671.
61. Ferrer, M. Antibiotic use and microbiome function / M. Ferrer [et al.] // *Biochemical pharmacology*. – 2017. – V. 134. – P. 114–126.
62. Flament-Simon, S. C. Association between kinetics of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli* / Flament- S. C. Simon [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10(5). – P. 1–11.
63. Forrester, S. J. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling / S. J. Forrester [et al.] // *Circulation Research*. – 2018. – V. 122(6). – P. 877–902.
64. Foster, J. W. *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile / J. W. Foster // *Nature Reviews Microbiology*. – 2004. – V. 2 (11). – P. 898–907.
65. Foyer, C. H. Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics, and redox signaling / C. H. Foyer [et al.] // *Annual Review of Plant Biology*. – 2009. – V. 60. – P. 455–484.
66. Freter, R. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract / R. Freter [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1983. – V. 39(2). – P. 686–703.
67. Fuller A. Is p-aminobenzenesulphonamide the active agent in prontosil therapy? / A. Fuller // *The Lancet*. – 1937. – V. 229(5917). – P. 194–198.
68. Galvis, J. E. A. Metataxonomic review to elucidate the role of the microbiome in Celiac disease across the gastrointestinal tract / J. E. A. Galvis [et al.] // *bioRxiv*. – 2021. Preprint.
69. Gámez-Valdez, J. S. Differential analysis of the bacterial community in colostrum samples from women with gestational diabetes mellitus and obesity / J. S. Gámez-Valdez [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – V. 11(1).
70. Gao, J. Current scenario of quinolone hybrids with potential antibacterial activity against ESKAPE pathogens / J. Gao, H. Hou, F. Gao // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2023. – V. 247. – № 115026.

71. Gao, Y. D. Metabolic modeling of common *Escherichia coli* strains in human gut microbiome / Y. D. Gao, Y. Zhao, J. Huang // BioMed Research International. – 2014. – V. 2014. – № 694967.
72. Gao, Y. The maternal gut microbiome during pregnancy and offspring allergy and asthma / Y. Gao [et al.] // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2021. – V. 148(3). – P. 669–678.
73. Gao, Y. Q. A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F₁-ATPase / Y. Q. Gao, W. Yang, M. Karplus // Cell. – 2005. – V. 123(2). – P. 195–205.
74. Gaschler, M. M. Lipid peroxidation in cell death / M. M. Gaschler, B. R. Stockwell // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2017. – V. 482(3). – P. 419–425.
75. Ghanayem, B. Investigation of xenobiotics metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity using Cyp2e1^{-/-} mice / B. Ghanayem, U. Hoffler // Current Drug Metabolism. – 2007. – V. 8(7). – P. 728–749.
76. Gholizadeh, P. Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease / P. Gholizadeh [et al.] // Microbial Pathogenesis. – 2019. – V. 127. – P. 48–55.
77. Ghosh, S. Structural diversity, functional aspects and future therapeutic applications of human gut microbiome / S. Ghosh, S. Pramanik // Archives of Microbiology. – 2021. – V. 203(9). – P. 5281–5308.
78. Gieryńska, M. Integrity of the intestinal barrier: the involvement of epithelial cells and microbiota—a mutual relationship / M. Gieryńska [et al.] // Animals. – 2022. – V.12 (2). – № 145.
79. Gonzalez-Flecha, B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli* / B. Gonzalez-Flecha, B. Demple // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – V. 270(23). – P. 13681–13687.

80. Graf, U. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* / U. Graf [et al.] // Environmental Mutagenesis. – 1984. – V. 6(2). – P. 153–188.
81. Greenberg, J. T. Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for resistance to H₂O₂ and gamma radiation / J. T. Greenberg, B. Demple // Journal of Bacteriology. – 1986. – V. 168(2). – P. 1026–1029.
82. Griffith, K. L. Measuring β -galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays / K. L. Griffith, R. E. Wolf // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2002. – V. 290(1). – P. 397–402.
83. Gulcin, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview / İ. Gulcin // Archives of Toxicology. – 2020. – V.94 (3). – P. 651–715.
84. Gulcin, I. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method / I. Gulcin, S. H. Alwasel // Processes. – 2022. – V. 10(1). – № 132.
85. Guo, H. Structure of a bacterial ATP synthase / H. Guo, T. Suzuki, J. L. Rubinstein // eLife. – 2019. – V. 8. – P. 1–17.
86. Gutteridge, J. M. C. Mini-review: oxidative stress, redox stress or redox success? / J. M. C. Gutteridge, B. Halliwell // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2018. – V. 502. – P. 183-186.
87. Haiser, H. J. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta* / H. J. Haiser [et al.] // Science. – 2013. – V. 341. – P. 295–298.
88. Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // Oxford University Press: Oxford, 1999. - 936 p.
89. Heeney, D. D. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? / D. D. Heeney, M. G. Gareau, M. L. Marco // Curr. Opin. Biotechnol. – 2018. – V. 49. – P. 140-147.
90. Heintz-Buschart, A. Human gut microbiome: function matters / A. Heintz-Buschart, P. Wilmes // Trends in Microbiology. – 2018. – V. 26(7). – P. 563–574.

91. Henkel, S. G. Basic regulatory principles of *Escherichia coli*'s electron transport chain for varying oxygen conditions / S. G. Henkel [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – V. 9(9). – № e107640.
92. Hill, D. A. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis / D. A. Hill [et al.] // Mucosal Immunology. – 2010. – V. 3(2). – P. 148–158.
93. Hirst, S. M. Bio-distribution and *in vivo* antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice / S. M. Hirst [et al.] // Environmental Toxicology. – 2013. – V. 28(2). – P. 107–118.
94. Hodder, P. S. Equilibrium and kinetic measurements of muscarinic receptor antagonism on living cells using bead injection spectroscopy / P. S. Hodder, C. Beeson, J. Ruzicka // Analytical Chemistry. – 2000. – V. 72(14). – P. 3109–3115.
95. Hong, Y. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species / Y. Hong [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2019. – V. 116(20). – P. 10064–10071.
96. Hoyles, L. Diversity of the class *Coriobacteriia* within different ecosystems / L. Hoyles // Access Microbiology. – 2019. – V. 1(7). – P. 1.
97. Ighodaro, O. M. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid / O. M. Ighodaro, O. A. Akinloye // Alexandria Journal of Medicine. – 2018. – V. 54. – P. 287–293.
98. Imlay, J. A. How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis / J. A. Imlay // Advances in microbial physiology. – 2002. – V. 46. – P. 111–153.
99. Imlay, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium / J. A. Imlay // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – V. 11(7). – P. 443–454.
100. Imlay, J. A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? / J. A. Imlay // Environmental Microbiology. – 2019. – V. 21(2). – P. 521–530.

101. Ingram, S. Reactive oxygen species : rapid fire in inflammation / S. Ingram, M. D. Brighton // *Biochemist.* – 2017. – V. 39(4). – P. 30–33.
102. Jackson, M. A. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota / M. A. Jackson [*et al.*] // *Gut.* – 2016. – V. 65(5). – P. 749–756.
103. Jacobsen, N. R. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-}-mice / N. R. Jacobsen [*et al.*] // *Particle and Fibre Toxicology.* – 2009. – V. 6. – P. 1–17.
104. Jiang, S. Anti-cancer activity of benzoxazinone derivatives via targeting c-Myc G-quadruplex structure / S. Jiang [*et al.*] // *Life Sciences.* – 2020. – V. 258. – № 118252.
105. JRC F7. Knowledge Health and Consumer Safety, The Human Gut Microbiota: Overview and analysis of the current scientific knowledge and possible impact on healthcare and well-being / EUR 29240 EN // Publications Office of the European Union, Luxembourg. – 2018. – P. 1-64.
106. Heddle, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage / J. A. Heddle // *Mutation Research.* – 1973. – V. 18(2). – P. 187–190.
107. Kaila, V. R. I. Architecture of bacterial respiratory chains / V. R. I. Kaila, M. Wikström // *Nature Reviews Microbiology.* – 2021. – V. 19(5). – P. 319–330.
108. Kaper, J. B. Pathogenic *Escherichia coli* / J. B. Kaper, J. P. Nataro, H. L. T. Mobley // *Nature Reviews Microbiology.* – 2004. – V. 2(2). – P. 123–140.
109. Kathrotiya, H. G. Synthesis and identification of β -aryloxyquinoline based diversely fluorine substituted N-aryl quinolone derivatives as a new class of antimicrobial, antituberculosis and antioxidant agents / H. G. Kathrotiya, M. P. Patel // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2013. – V. 63. – P. 675-684.
110. Kaur, N. Peroxisome biogenesis and function / N. Kaur, S. Reumann, J. Hu // *The Arabidopsis Book.* – 2009. – V.7. – P. 1–41.
111. Kazemian, N. Gut microbiota and cardiovascular disease: opportunities and challenges / N. Kazemian [*et al.*] // *Microbiom.* – 2020. – V. 8 (36). – P. 1–17.

112. Kho, Z. Y. The human gut microbiome - a potential controller of wellness and disease / Z. Y. Kho, S. K. Lal // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V.9. – P. 1–23.
113. Kim, D. H. Gut microbiota-mediated drug-antibiotic interactions / D.-H. Kim // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2015. – V. 43. – P. 1581–1589.
114. Konstantinidis, T. Effects of antibiotics upon the gut microbiome: a review of the literature / T. Konstantinidis [et al.] // *Biomedicines*. – 2020. – V.8 (11). – P. 1–15.
115. Koppel, N. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota / N. Koppel, V. M. Rekdal, E. P. Balskus // *Science*. – 2017. – V. 356(6344). – P. 1246–1257.
116. Kruszewski, M. Comet assay in neural cells as a tool to monitor DNA damage induced by chemical or physical factors relevant to environmental and occupational exposure / M. Kruszewski [et al.] // *Mutation Research*. – 2019. – V. 845. – № 402990.
117. Lei, X. G. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications / X. G. Lei [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2015. – V. 96(1). – P. 307–364.
118. Liang, N. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanism of action / N. Liang, D. D. Kitts // *Molecules*. – 2014. – V. 19(11). – P. 19180–19208.
119. Liu, N. Synthesis and SAR studies of 1,4-benzoxazine MenB inhibitors: novel antibacterial agents against *Mycobacterium tuberculosis* / N. Liu [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – V. 20. – P. 6306–6309.
120. Liu, Y. Disorder of gut amino acids metabolism during CKD progression is related with gut microbiota dysbiosis and metagenome change / Y. Liu [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2018. – V. 149. – P. 425–435.
121. Maier, L. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria / L. Maier [et al.] // *Nature*. – 2018. – V. 555. – P. 623–628.
122. Marchesi, J. R. The vocabulary of microbiome research: a proposal / J. R. Marchesi, J. Ravel // *Microbiome*. – 2015. – V. 3(1). – P. 1–3.

123. Marcos, R. The SMART assays of *Drosophila*: wings and eyes as target tissues / R. Marcos, L. M. Sierra, I. Gaivão // Genotoxicity and DNA Repair. Methods in Pharmacology and Toxicology. – Humana Press, New York, NY, 2014. – P. 283-295.

124. Marinova, G. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH / G. Marinova, V. Batchvarov // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2011. – V. 17(1). – P. 11–24.

125. Matthewman, C. Systems to model the personalized aspects of microbiome health and gut dysbiosis / C. Matthewman [et al.] // Molecular Aspects of Medicine. – 2023. – V. 91. – № 101115.

126. McBee, M. E. Production of superoxide in bacteria is stress- and cell state-dependent: a gating-optimized flow cytometry method that minimizes ROS measurement artifacts with fluorescent dyes / M. E. McBee [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 1–17.

127. Meister, A. Glutathione / A. Meister, M. E. Anderson // Annu Rev Biochem. – 1983. – V. 52. – P. 711–760.

128. Messner, K. R. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli* / K. R. Messner, J. A. Imlay // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – V. 274(15). – P. 10119–10128.

129. Michalak, K. Treatment of the fluoroquinolone-associated disability: the pathobiochemical implications / K. Michalak [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – V. 2017. – № 8023935.

130. Miller, J.H. Experiments in molecular genetics / J.H. Miller // Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. – 466 p.

131. Mišík, M. Use of human derived liver cells for the detection of genotoxins in comet assays / M. Mišík [et al.] // Mutation Research. – 2019. – V. 845. – № 402995.

132. Miyake, S. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to clostridia XIVa and IV clusters / S. Miyake [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – V. 10(9). – P. 1–16.

133. Morgan, X. C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome / X. C. Morgan, N. Segata, C. Huttenhower // Trends in Genetics. – 2013. – V. 29(1). – P. 51-58.

134. Mortelmans, K. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2 / K. Mortelmans, E. S. Riccio // Mutation Research. – 2000. – V. 455. – P. 61–69.

135. Moura, C. S. Assessment of antioxidant activity, lipid profile, general biochemical and immune system responses of Wistar rats fed with dairy dessert containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 / C. S. Moura [et al.] // Food Research International. – 2016. – V. 90. – P. 275–280.

136. Mu, C. Antibiotic effects on gut microbiota, metabolism, and beyond / C. Mu, W. Zhu // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – V. 103(23–24). – P. 9277–9285.

137. Mueller, N. T. The infant microbiome development: mom matters / N. T. Mueller [et al.] // Trends Mol Med. – 2015. – V. 21(2). – P. 109–117.

138. Munteanu, I. G. Analytical methods used in determining antioxidant activity : a review / I. G. Munteanu, C. Apetrei // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – V. 22. – № 3380.

139. Nakanishi-Matsui, M. ATP synthase from *Escherichia coli*: mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols / M. Nakanishi-Matsui, M. Sekiya, M. Futai // Biochimica et Biophysica Acta. – 2016. – V. 1857(2). – P. 129–140.

140. Nayfach, S. New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome / S. Nayfach [et al.] // Nature. – 2019. – V. 568(7753). – P. 505–510.

141. Nazarewicz, R. R. Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress / R. R. Nazarewicz [et al.] // American Journal of Physiology. – 2013. – V. 305(8). – P. 1131–1140.

142. Niki, E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? / E. Niki // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – V. 124. – № 564.

143. Nimse, S. B. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms / S. B. Nimse, D. Pal // RSC Advances. – 2015. – V.5 (35). – P. 27986–28006.
144. Oda, Y. Advanced approaches to model xenobiotic metabolism in bacterial genotoxicology in vitro / Y. Oda // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. – 2017. – V. 157. – P. 97–134.
145. OECD. Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test / OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 // OECD Publishing, Paris. – 2016.
146. Olson, K. R. Reactive oxygen species or reactive sulfur species: Why we should consider the latter / K. R. Olson // Journal of Experimental Biology. – 2020. – V. 223(4). – № 196352.
147. Ostling O. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells / O. Ostling, K.J. Johanson // Biochem Biophys Res Commun. – 1984. – V. 123(1). – P. 291–298.
148. Ou, B. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe / B. Ou [*et al.*] // J. Agric. Food Chem. – 2001. – V. 49. – P. 4619–4626.
149. Pandey, K. B. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells / K. B. Pandey, S. I. Rizvi // Biomedical Papers. – 2011. – V. 155(2). – P. 131–136.
150. Parker, A. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health / A. Parker, S. Fonseca, S. R. Carding // Gut Microbes. – 2020. – V. 11(2). – P. 135–157.
151. Pearson-Leary, J. The gut microbiome regulates the increases in depressive-type behaviors and in inflammatory processes in the ventral hippocampus of stress vulnerable rats / J. Pearson-Leary [*et al.*] // Molecular Psychiatry. – 2020. – V. 25(5). – P. 1068–1079.
152. Peng, J. Interaction between gut microbiome and cardiovascular disease / J. Peng [*et al.*] // Life Sciences. – 2018. – V. 214. – P. 153–157.

153. Pflughoeft, K. J. Human microbiome in health and disease / K. J. Pflughoeft, J. Versalovic // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2012. – V. 7(1). – P. 99–122.
154. Pisoschi, A. M. Methods for total antioxidant activity determination: a review / A. M. Pisoschi, G. P. Negulescu // *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. – 2012. – V. 01(01). – P. 1–10.
155. Planas-Portell, J. Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana* / Planas-Portell, J. [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2013. – V. 13. – P. 1–13.
156. 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. – P. 4290–4302.
157. Quillardet, P. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity / P. Quillardet [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1982. – V. 79(19 I). – P. 5971–5975.
158. Radi, R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects / R. Radi // *Accounts of Chemical Research*. – 2013. – V. 46(2). – P. 550–559.
159. Ramming, T. GPx8 peroxidase prevents leakage of H₂O₂ from the endoplasmic reticulum / T. Ramming [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – V. 70. – P. 106–116.
160. Richter, C. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive / C. Richter, J. W. Park, B. N. Ames // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1988. – V. 85(17). – P. 6465–6467.
161. Richter, T. K. S. Responses of the human gut *Escherichia coli* population to pathogen and antibiotic disturbances / T. K. S. Richter [et al.] // *mSystems*. – 2018. – V. 3(4). – P. 1–15.

162. Rizkallah, M. The human microbiome project, personalized medicine and the birth of pharmacomicrobiomics / M. Rizkallah, R. Saad, R. Aziz // *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. – 2012. – V. 8(3). – P. 182–193.
163. Rizzo, A. Endogenous antioxidants and radical scavengers / A. Rizzo [*et al.*] // *Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology* / Springer. - Boston, MA, 2010. – P. 52–67.
164. Rodrigues, M. A. An automated method to perform the in vitro micronucleus assay using multispectral imaging flow cytometry / M. A. Rodrigues // *Journal of Visualized Experiments*. – 2019. – V.147. – P. 1–13.
165. Rowland, I. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components / I. Rowland [*et al.*] // *European Journal of Nutrition*. – 2018. – V. 57(1). – P. 1–24.
166. Saitta, K. S. Bacterial β -glucuronidase inhibition protects mice against enteropathy induced by indomethacin, ketoprofen or diclofenac: mode of action and pharmacokinetics / K. S. Saitta [*et al.*] // *Xenobiotica*. – 2014. – V. 44(1). – P. 28–35.
167. Sandalio, L. M. Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks / L. M. Sandalio, M. C. Romero-Puertas // *Annals of Botany*. – 2015. – V. 116(4). – P. 475–485.
168. Sankararaman, S. Gut microbiome and its impact on obesity and obesity-related disorders / S. Sankararaman [*et al.*] // *Current Gastroenterology Reports*. – 2023. – V. 25(2). – P. 31–44.
169. Sankar, S. A. The human gut microbiome, a taxonomic conundrum / S. A. Sankar [*et al.*] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2015. – V. 38(4). – P. 276–286.
170. Santos-Marcos, J. A. Interplay between gonadal hormones and postnatal overfeeding in defining sex-dependent differences in gut microbiota architecture / J. A. Santos-Marcos [*et al.*] // *Aging*. – 2020. – V. 12(20). – P. 19979–19999.
171. Schmid, W. The micronucleus test / W. Schmid // *Mutat. Res.* – 1975. – V. 31. – P. 9–15.

172. Schniertshauer, D. Natural mitochondria targeting substances and their effect on cellular antioxidant system as a potential benefit in mitochondrial medicine for prevention and remediation of mitochondrial dysfunctions / D. Schniertshauer, S. Wespel, J. Bergemann // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. – V. 45(5). – P. 3911–3932.

173. Schupack, D. A. The promise of the gut microbiome as part of individualized treatment strategies / D. A. Schupack [*et al.*] // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. – 2022. – V. 19(1). – P. 7–25.

174. Seaver, L. C. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli* / L. C. Seaver, J. A. Imlay // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183(24). – P. 7173–7181.

175. Sharma, P. On the function of the various quinone species in *Escherichia coli* / P. Sharma [*et al.*] // *FEBS Journal*. – 2012. – V. 279(18). – P. 3364–3373.

176. Shreiner, A. B. The gut microbiome in health and in disease / A. B. Shreiner, J. Y. Kao, V. B. Young // *Curr Opin Gastroenterol*. – 2015. – V. 31(1). – P. 69–75.

177. Sies, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine / H. Sies // *Redox Biology*. – 2015. – V.4. – P. 180–183.

178. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D. P. Jones // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2020. – V. 21(7). – P. 363–383.

179. Sies, H. Oxidative stress / H. Sies, C. Berndt, D. P. Jones // *Annual Review of Biochemistry*. – 2017. – V. 86. – P. 715–748.

180. Singh, N. P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells / N. P. Singh [*et al.*] // *Experimental Cell Research*. – 1988. – V. 175(1). – P. 184–191.

181. Smirnova, G. V. Effects of menadione and hydrogen peroxide on glutathione status in growing *Escherichia coli* / G. V. Smirnova [*et al.*] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2000. – V. 28(7). – P. 1009–1016.

182. Smirnova, G. V. Extracellular superoxide provokes glutathione efflux from *Escherichia coli* cells / G. V. Smirnova [et al.] // Research in Microbiology. – 2015. – V. 166(8). – P. 609–617.
183. Smirnova, G. V. Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress / G. V. Smirnova [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2009. – V. 46(6). – P. 759–768.
184. Smirnova, G. V. Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells / G. V. Smirnova [et al.] // Amino Acids. – 2019. – V. 51(10–12). – P. 1577–1592.
185. Smirnova, G. V. Study of the relationship between extracellular superoxide and glutathione production in batch cultures of *Escherichia coli* / G. V. Smirnova [et al.] // Research in Microbiology. – 2020. – V. 171(8). – P. 301–310.
186. Smirnova, G. V. Study of the contribution of active defense mechanisms to ciprofloxacin tolerance in *Escherichia coli* growing at different rates / G. V. Smirnova [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. – 2022. – V. 115(2). – P. 233–251.
187. Snezhkina, A. V. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells / A. V. Snezhkina [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020. – T. 2019. – № 6175804.
188. Sobti, M. Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three rotational states / M. Sobti [et al.] // eLife. – 2016. – V. 5. – P. 1–18.
189. So, S. Y. Gut feelings: the microbiota-gut-brain axis on steroids / S. Y. So, T. C. Savidge // American Journal of Physiology. – 2022. – V. 322(1). – P. 1–20.
190. Soukup, S. T. Metabolism of daidzein and genistein by gut bacteria of the class *Coriobacteriia* / S. T. Soukup [et al.] // Foods. – 2021. – V. 10(11). – № 10112741.
191. Stepanova, E. E. Synthesis, *in vitro* antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, and reverse docking-based target fishing of 1,4-benzoxazin-2-one derivatives / E. E. Stepanova [et al.] // Archiv der Pharmazie. – 2021. – V. 354(2). – P. 10–12.

192. Stiernborg, M. Bacterial gut microbiome differences in adults with ADHD and in children with ADHD on psychostimulant medication / M. Stiernborg [et al.] // *Brain, behavior, and immunity*. – 2023. – V. 110. – P. 310–321.
193. Stoia, M. Low-molecular-weight synthetic antioxidants: classification, pharmacological profile, effectiveness and trends / M. Stoia, S. Oancea // *Antioxidants*. – 2022. – V. 11(4). – № 11040638.
194. Strong, H. A. The reduction of sulphinpyrazone and sulindac by intestinal bacteria / H. A. Strong [et al.] // *Xenobiotica*. – 1987. – V. 17(6). – P. 685–696.
195. Sublette, M. E. Bipolar disorder and the gut microbiome: a systematic review / M. E. Sublette [et al.] // *Bipolar Disorders*. – 2021. – V. 23(6). – P. 544–564.
196. Sun, J. Exploring gut microbes in human health and disease: pushing the envelope / J. Sun, E. B. Chang // *Genes and Diseases*. – 2014. – V. 1(2). – P. 132–139.
197. Sun, Y. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes / Y. Sun [et al.] // *Redox Biology*. – 2020. – V. 37. – № 101696.
198. Tabrez, S. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface waters: an overview of the techniques and their efficacies / S. Tabrez [et al.] // *Journal of Environmental Science and Health*. – 2011. – V. 29(3). – P. 250–275.
199. Tenaillon, O. The population genetics of commensal *Escherichia coli* / O. Tenaillon [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – V. 8(3). – P. 207–217.
200. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome / C. Huttenhower [et al.] // *Nature*. – 2012. – V. 486(7402). – P. 207–214.
201. Tian, R. Small and mighty: adaptation of superphylum *Patescibacteria* to groundwater environment drives their genome simplicity / R. Tian [et al.] // *Microbiome*. – 2020. – V. 8(1).
202. Tsamakakis, K. Gut microbiome: a brief review on its role in schizophrenia and first episode of psychosis / K. Tsamakakis [et al.] // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10(6). – P. 1–14.

203. Tyulenev, A. The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures / A. Tyulenev [et al.] // *Bioelectrochemistry*. – 2018. – V. 121. – P. 11–17.

204. Urbaniak, A. Quantum-chemical calculations of the antioxidant properties of trans-p-coumaric acid and trans-sinapinic acid / A. Urbaniak, M. Molski, M. Szeląg // *Computational Methods in Science and Technology*. – 2012. – V. 18(2). – P. 117–128.

205. Valko, M. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease / M. Valko [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2016. – V. 90(1). – P. 1–37.

206. Valko, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko [et al.] // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2007. – V. 39. – P. 44–84.

207. van Beilen, J. W. A. All three endogenous quinone species of *Escherichia coli* are involved in controlling the activity of the aerobic/anaerobic response regulator ArcA / J. W. A. van Beilen, K. J. Hellingwerf // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 1–11.

208. Vich Vila, A. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota / A. Vich Vila [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – V. 11(1). – P. 1–11.

209. Vik, S. B. Structure and function of subunit a of the ATP synthase of *Escherichia coli* / S. B. Vik, R. R. Ishmukhametov // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2005. – V. 37(6). – P. 445–449.

210. Wallen, Z. D. Metagenomics of Parkinson's disease implicates the gut microbiome in multiple disease mechanisms / Z. D. Wallen [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – V. 13(1).

211. Wang, M. M. Comparative effect of ciprofloxacin and moxifloxacin on the modulation of bile acid profiles and gut microbiota in rats / M. M. Wang [et al.] // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2022. – V. 58. – № 191086.

212. Wang, T. Bacterial persistence induced by salicylate via reactive oxygen species / T. Wang, I. El Meouche, M. J. Dunlop // *Scientific Reports*. – 2017. – V.7.
213. Wang, W. L. Application of metagenomics in the human gut microbiome / W. L. Wang [*et al.*] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – V. 21(3). – P. 803–814.
214. Weersma, R. K. Interaction between drugs and the gut microbiome / R. K. Weersma, A. Zhernakova, J. Fu // *Gut*. – 2020. – V. 69(8). – P. 1510–1519.
215. Weidinger, A. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction / A. Weidinger, A. V. Kozlov // *Biomolecules*. – 2015. – V.5 (2). – P. 472–484.
216. West, K. A. Multi-angle meta-analysis of the gut microbiome in autism spectrum disorder: a step toward understanding patient subgroups / K. A. West [*et al.*] // *Scientific Reports*. – 2022. – V. 12(1). – P. 1–13.
217. White, A. P. Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity / A. P. White [*et al.*] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – V. 77(21). – P. 7620–7632.
218. Wilson, I. D. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity / I. D. Wilson, J. K. Nicholson // *Translational Research*. – 2017. – V. 179. – P. 204–222.
219. Witkowski, M. Gut microbiota and cardiovascular disease / M. Witkowski, T. L. Weeks, S. L. Hazen // *Circulation Research*. – 2020. – V. 127(4). – P. 553–570.
220. Wood, L. G. A review of the methodology for assessing *in vivo* antioxidant capacity / L. G. Wood, P. G. Gibson, M. L. Garg // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2006. – V. 86. – P. 2057–2066.
221. Xiang, K. Causal effects of gut microbiome on systemic lupus erythematosus: a two-sample mendelian randomization study / K. Xiang [*et al.*] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – V. 12. – P. 1–10.
222. Xiao, F. Guidelines for antioxidant assays for food components / F. Xiao [*et al.*] // *Food Frontiers*. – 2020. – V. 1(1). – P. 60–69.

223. Xiao, Z. P. Synthesis, structure, and structure-activity relationship analysis of enamines as potential antibacterials / Z. P. Xiao [*et al.*] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2007. – V. 15(12). – P. 4212–4219.
224. Xu, M. Difference in post-stress recovery of the gut microbiome and its altered metabolism after chronic adolescent stress in rats / M. Xu [*et al.*] // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10(1). – P. 1–10.
225. Yang, H. Y. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review / H. Y. Yang, T. H. Lee // *BMB Reports*. – 2015. – V. 48(4). – P. 200–208.
226. Yang, J. *Oscillospira* - a candidate for the next-generation probiotics / J. Yang [*et al.*] // *Gut Microbes*. – 2021. – V. 13(1). – № 1987783.
227. Yiu, J. H. C. Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism / J. H. C. Yiu, B. Dorweiler, C. W. Woo // *Journal of Molecular Medicine*. – 2017. – V. 95(1). – P. 13–20.
228. Zakharenko, L. P. Determination of mutagenicity of chemical compounds, physical factors and environmental pollutants by the *Drosophila melanogaster* wing somatic mutation and recombination test / L. P. Zakharenko, I. K. Zakharov // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2016. – V. 20(1). – P. 72–77.
229. Zampieri, D. Design, synthesis and antimycobacterial activity of benzoxazinone derivatives and open-ring analogues: preliminary data and computational analysis / D. Zampieri [*et al.*] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – V. 29(17). – P. 2468–2474.
230. Zeb, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods / A. Zeb // *Journal of Food Biochemistry*. – 2020. – V. 44(9). – № 13394.
231. Zheng, Y. Z. Theoretical studies on the antioxidant activity of pinobanksin and its ester derivatives: effects of the chain length and solvent / Y. Z. Zheng [*et al.*] // *Food Chemistry*. – 2018. – V. 240. – P. 323–329.
232. Zsálíg, D. A Review of the relationship between gut microbiome and obesity / D. Zsálíg [*et al.*] // *Applied Sciences*. – 2023. – V. 13(1). – P. 1–16.

Таблица А.2 – Влияние введения CBR-124 на микробиомный состав кишечника крыс.

До введения							После введения							Mann-Whitney p-value	Mann-Whitney p-value (ALDEx2)	R	
♂ 1	♂ 2	♂ 3	♀ 1	♀ 2	♀ 3	средне ε	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♀ 1	♀ 2	♀ 3	средне ε				
класс <i>Bacilli</i> семейство <i>Lactobacillaceae</i>																	
699,8	12784,8	868,4	664,4	3380,9	1238,0	<u>3272,7</u>	20025,4	1640,2	10167,0	6813,0	5123,8	13465,0	<u>9539,1</u>	<u>0,04</u>	<u>0,178</u>	<u>0,63</u>	
филум <i>Patescibacteria</i> род <i>Candidatus Saccharimonas</i>																	
1918,6	683,3	4971,0	2968,8	3582,9	2389,1	<u>2752,3</u>	504,8	47,0	976,3	2387,4	1346,8	2299,4	<u>1260,3</u>	<u>0,06</u>	<u>0,0073</u>	<u>-0,58</u>	
филум <i>Verrucomicrobia</i> вид <i>Akkermansia muciniphila</i>																	
41147,3	12782,6	9988,3	5199,0	12353,4	1131,7	<u>13767,1</u>	2611,7	21161,4	764,5	14,9	21,4	12,5	<u>4097,7</u>	<u>0,06</u>	<u>0,0676</u>	<u>-0,58</u>	
класс <i>Clostridia</i>																	
5514,6	34516,1	43510,0	45906,1	33728,9	41419,3	<u>34099,2</u>	37593,3	33177,9	42300,4	45376,6	51433,8	40381,2	<u>41710,5</u>	<u>0,59</u>	<u>0,478</u>	<u>0,19</u>	
класс <i>Clostridia</i> отряд <i>Clostridia UCG-014</i>																	
0,0	275,7	31,3	121,6	57,2	107,6	<u>98,9</u>	29994,7	997,7	874,2	1871,7	4531,0	1668,0	<u>6656,2</u>	<u>0,002</u>	<u>0,007</u>	<u>0,87</u>	
класс <i>Clostridia</i> отряд <i>Oscillospirales</i>																	
1750,0	3128,1	2605,3	1828,0	6609,3	2313,9	<u>3039,1</u>	1751,6	8268,0	5827,0	7091,3	36006,5	24047,6	<u>13832,0</u>	<u>0,06</u>	<u>0,5886</u>	<u>0,58</u>	
класс <i>Clostridia</i> отряд <i>Monoglobales</i>																	
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<u>0,0</u>	537,5	148,9	1738,7	486,4	1244,5	333,0	<u>748,2</u>	<u>0,003</u>	<u>0,0001</u>	<u>0,93</u>	

Таблица А.3 – Влияние введения CBR-384 на микробиомный состав кишечника крыс.

До введения							После введения							Mann-Whitney у p-value	Mann-Whitney p-value (ALDEX2)	R	
♂ 1	♂ 2	♂ 3	♀ 1	♀ 2	♀ 3	средне е	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♀ 1	♀ 2	♀ 3	средне е				
филум <i>Verrucomicrobia</i> вид <i>Akkermansia muciniphila</i>																	
1931,7	577,8	5863,8	830,9	5423,0	13529,7	<u>4692,8</u>	19457,0	13798,6	28046,7	10490,9	4295,5	26035,1	<u>17020,6</u>	<u>0,026</u>	<u>0,0163</u>	<u>0,68</u>	
класс <i>Clostridia</i>																	
32095,4	8912,0	48144,8	44446,1	37599,2	28838,1	<u>33339,3</u>	33612,8	27807,2	25973,7	25181,8	33750,9	19383,2	<u>27618,3</u>	<u>0,240</u>	<u>0,426</u>	<u>-0,39</u>	
класс <i>Clostridia</i> отряд <i>Clostridia UCG-014</i>																	
16,3	0,0	0,0	12,1	166,5	101,9	<u>49,5</u>	23962,2	1247,5	11099,6	1730,1	1997,5	1008,1	<u>6840,8</u>	<u>0,005</u>	<u>0,005</u>	<u>0,87</u>	
класс <i>Clostridia</i> семейство <i>Lachnospiraceae</i>																	
26233,8	6330,4	46486,8	40808,0	27981,8	21986,6	<u>28304,6</u>	5507,4	13905,6	4610,6	17404,6	25655,8	7133,1	<u>12369,5</u>	<u>0,041</u>	<u>0,006</u>	<u>-0,63</u>	
класс <i>Bacilli</i> отряд <i>Lactobacillales</i>																	
5353,8	8989,3	3108,1	10467,4	8298,4	5149,6	<u>6894,4</u>	6008,0	14985,1	5653,7	21757,5	15262,7	13520,3	<u>12864,5</u>	<u>0,065</u>	<u>0,163</u>	<u>0,58</u>	
филум <i>Proteobacteria</i>																	
5213,1	29696,5	802,2	978,5	3047,8	2889,1	<u>7104,5</u>	305,1	441,6	300,5	808,5	671,7	1193,6	<u>620,2</u>	<u>0,015</u>	<u>0,095</u>	<u>-0,72</u>	
филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Alphaproteobacteria</i>																	
1452,8	9389,3	167,4	236,5	932,8	816,6	<u>2165,9</u>	59,8	90,1	60,7	155,9	131,6	283,2	<u>130,2</u>	<u>0,009</u>	<u>0,0213</u>	<u>-0,77</u>	
филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Alphaproteobacteria</i> семейство <i>Rhizobiaceae</i>																	
950,1	5743,0	120,4	128,4	687,8	508,2	<u>1356,3</u>	44,1	58,7	35,8	107,8	88,2	209,0	<u>90,6</u>	<u>0,009</u>	<u>0,003</u>	<u>-0,77</u>	

Продолжение таблицы А.3.

	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Alphaproteobacteria</i> семейство <i>Caulobacteraceae</i>															
407,2	3047,3	47,1	108,2	177,4	275,3	<u>677,1</u>	14,4	31,4	24,9	43,6	37,3	65,6	<u>36,2</u>	<u>0,004</u>	<u>0,006</u>	<u>-0,82</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gammaproteobacteria</i>															
3760,3	20307,2	634,8	742,0	2114,9	2055,3	<u>4935,7</u>	245,3	351,5	239,8	652,6	540,1	910,3	<u>489,9</u>	<u>0,015</u>	<u>0,075</u>	<u>-0,72</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gammaproteobacteria</i> семейство <i>Xanthomonadaceae</i>															
1868,8	9516,9	326,1	401,3	958,2	913,2	<u>2330,7</u>	85,9	159,3	112,1	214,0	183,9	382,2	<u>189,5</u>	<u>0,004</u>	<u>0,004</u>	<u>-0,82</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gammaproteobacteria</i> семейство <i>Xanthomonadaceae</i> вид <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>															
1652,7	8452,1	326,1	359,9	823,0	861,6	<u>2079,2</u>	73,2	157,7	94,2	178,1	161,5	351,3	<u>169,3</u>	<u>0,004</u>	<u>0,002</u>	<u>-0,82</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gammaproteobacteria</i> семейство <i>Enterobacteriaceae</i> род <i>Escherichia-Shigella</i>															
216,2	1259,9	46,0	27,3	142,8	92,6	<u>297,5</u>	7,4	14,5	10,1	37,4	23,7	63,1	<u>26,0</u>	<u>0,015</u>	<u>0,009</u>	<u>-0,72</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gammaproteobacteria</i> семейство <i>Pseudomonadaceae</i>															
1153,7	6629,9	229,8	275,0	802,7	758,3	<u>1641,6</u>	110,9	163,3	107,4	338,5	296,5	378,5	<u>232,5</u>	<u>0,065</u>	<u>0,023</u>	<u>-0,58</u>
	класс <i>Coriobacteriia</i>															
9493,7	12206,7	620,5	5425,2	2677,7	8835,4	<u>6543,2</u>	624,6	1685,9	149,5	2178,7	5363,5	1531,3	<u>1922,2</u>	<u>0,065</u>	<u>0,175</u>	<u>-0,58</u>
	класс <i>Coriobacteriia</i> семейство <i>Eggerthellaceae</i>															
1615,0	1505,3	181,7	754,1	769,8	2697,2	<u>1253,8</u>	85,6	460,9	67,7	218,6	285,6	698,8	<u>302,9</u>	<u>0,026</u>	<u>0,05</u>	<u>-0,68</u>

Таблица А.4 – Влияние введения CBR-376 на микробиомный состав кишечника крыс.

До введения							После введения							Mann-Whitney u p-value	Mann-Whitney p-value (ALDEx2)	R							
♂ 1	♂ 2	♂ 3	♀ 1	♀ 2	♀ 3	средне е	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♀ 1	♀ 2	♀ 3	среднее										
филум <i>Verrucomicrobia</i> вид <i>Akkermansia muciniphila</i>							9615,5	34668,5	41922,1	4867,9	7805,6	716,5	16599,3	23237,9	9917,1	23730,2	5114,8	15602,7	8300,9	14317,3	0,699	0,222	0,14
класс <i>Clostridia</i>							3460,2	15151,9	13890,0	43675,5	48356,8	47448,6	28663,9	21917,3	31746,3	25970,9	30582,4	13666,9	22799,7	24447,3	0,818	0,476	= 0,10
класс <i>Clostridia</i> семейство <i>Lachnospiraceae</i>							2457,1	13011,5	7527,6	39366,4	47304,0	44482,1	25691,4	7487,6	7099,4	6621,3	12581,0	10154,1	5244,9	8198,1	0,132	0,007	= 0,48
класс <i>Clostridia</i> семейство <i>Lachnospiraceae</i> род <i>Lachnospiraceae</i> UCG-006							1648,3	1267,3	269,8	2788,2	2371,6	4548,3	2148,9	133,2	76,0	184,0	381,4	132,5	91,3	166,4	0,004	0,002	= 0,82
класс <i>Clostridia</i> отряд <i>Clostridia</i> UCG-014							0,0	288,6	62,3	10,0	0,0	439,8	133,4	7245,5	10170,4	9893,3	2300,0	130,9	4151,4	5648,6	0,013	0,054	0,77
класс <i>Clostridia</i> отряд <i>Oscillospirales</i>							853,3	1579,0	6300,2	3845,8	1039,1	2199,1	2636,1	5471,4	10698,3	4667,8	9546,6	2806,7	9956,7	7191,2	0,026	0,062	0,68
класс <i>Clostridia</i> отряд <i>Monoglobales</i>							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	835,2	1154,0	1067,6	1878,6	127,7	653,6	952,8	0,003	0,0001	0,93
класс <i>Bacilli</i>							6516,7	7623,3	1025,8	5781,6	3178,5	4842,0	4828,0	10684,8	13219,1	5069,7	12770,1	22877,3	20545,1	14194,4	0,015	0,82	0,72

Продолжение таблицы А.4.

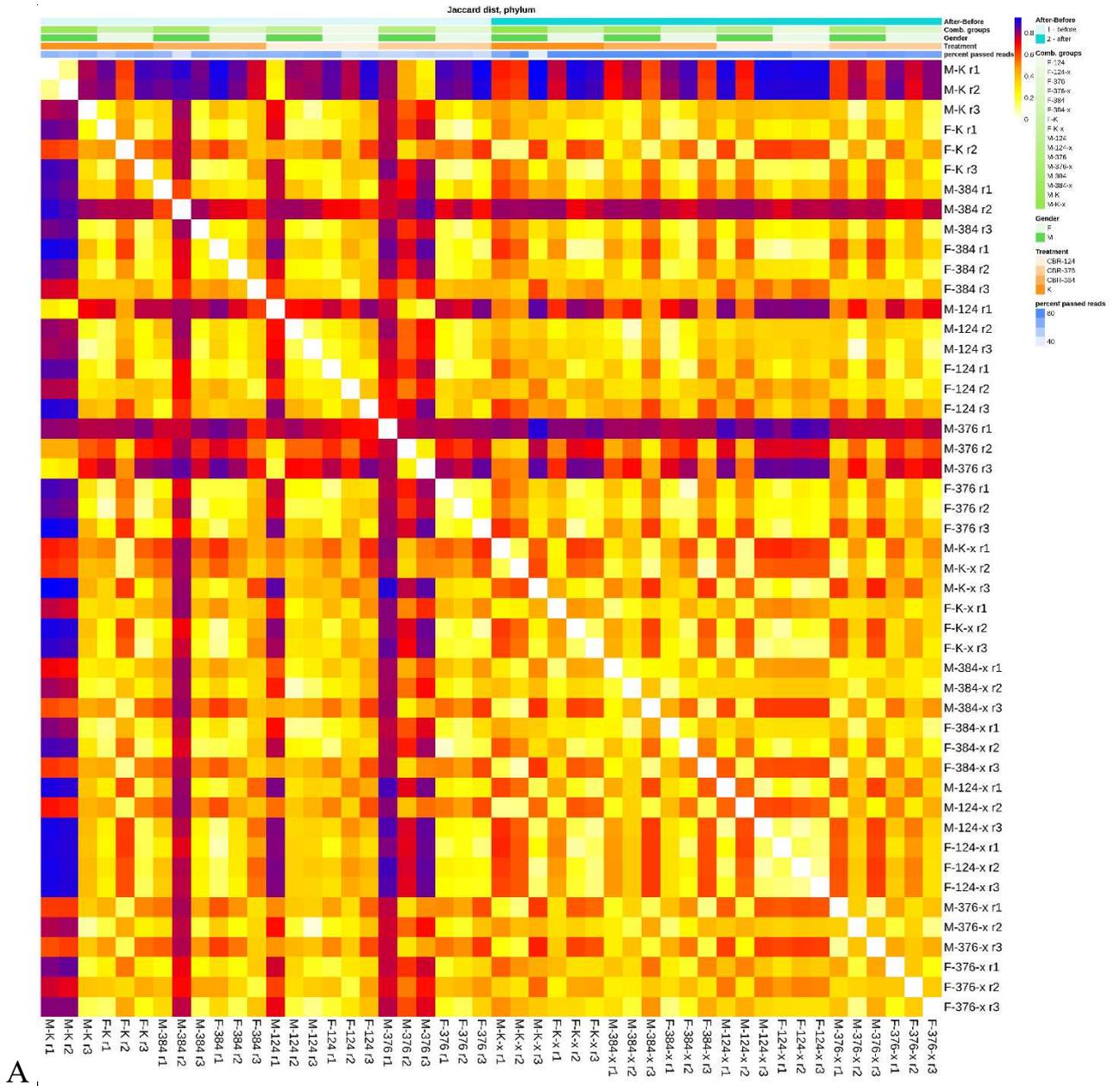
	класс <i>Bacilli</i> семейство <i>Lactobacillaceae</i>															
6187,3	6386,3	612,2	1566,6	2746,0	4646,2	<u>3690,8</u>	8644,3	11939,4	4108,7	9663,2	21872,3	18752,4	<u>12496,7</u>	<u>0,015</u>	<u>0,015</u>	<u>0,72</u>
	класс <i>Bacilli</i> семейство <i>Lactobacillaceae</i> род <i>Lactobacillus</i>															
3620,4	8,5	0,0	0,0	780,9	0,0	<u>735,0</u>	2652,7	4720,4	2025,1	6494,3	12833,1	14060,6	<u>7131,1</u>	<u>0,012</u>	<u>0,28</u>	<u>0,78</u>
	филум <i>Cyanobacteria</i>															
0,0	278,9	108,2	101,2	29,0	31,3	<u>91,5</u>	635,4	359,7	179,3	260,6	980,8	1053,4	<u>578,2</u>	<u>0,009</u>	<u>0,128</u>	<u>0,77</u>
	филум <i>Cyanobacteria</i> класс <i>Vampirivibrionia</i>															
0,0	278,9	108,2	101,2	29,0	31,3	<u>91,5</u>	635,4	359,7	179,3	260,6	980,8	1053,4	<u>578,2</u>	<u>0,009</u>	<u>0,218</u>	<u>0,77</u>
	филум <i>Proteobacteria</i>															
1274,3	228,0	0,0	667,1	177,3	185,3	<u>422,0</u>	769,7	1576,5	841,4	1641,2	3076,6	1162,9	<u>1511,4</u>	<u>0,015</u>	<u>0,255</u>	<u>0,72</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gamma</i> proteobacteria															
803,0	152,8	0,0	423,4	105,4	113,5	<u>266,4</u>	622,7	1234,1	680,9	1280,8	2288,1	914,6	<u>1170,2</u>	<u>0,009</u>	<u>0,139</u>	<u>0,77</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gamma</i> proteobacteria семейство <i>Xanthomonadaceae</i>															
406,1	110,4	0,0	315,0	105,4	113,5	<u>175,1</u>	234,7	439,7	278,9	501,2	929,1	346,9	<u>455,1</u>	<u>0,041</u>	<u>0,099</u>	<u>0,63</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gamma</i> proteobacteria семейство <i>Enterobacteriaceae</i>															
78,9	0,0	0,0	45,6	0,0	0,0	<u>20,8</u>	33,8	58,8	41,0	69,3	111,5	45,6	<u>60,0</u>	<u>0,087</u>	<u>0,329</u>	<u>0,54</u>
	филум <i>Proteobacteria</i> класс <i>Gamma</i> proteobacteria семейство <i>Pseudomonadaceae</i>															
220,8	42,4	0,0	0,0	0,0	0,0	<u>43,</u>	265,4	616,0	298,8	584,2	1042,2	429,0	<u>539,3</u>	<u>0,004</u>	<u>0,075</u>	<u>0,88</u>

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

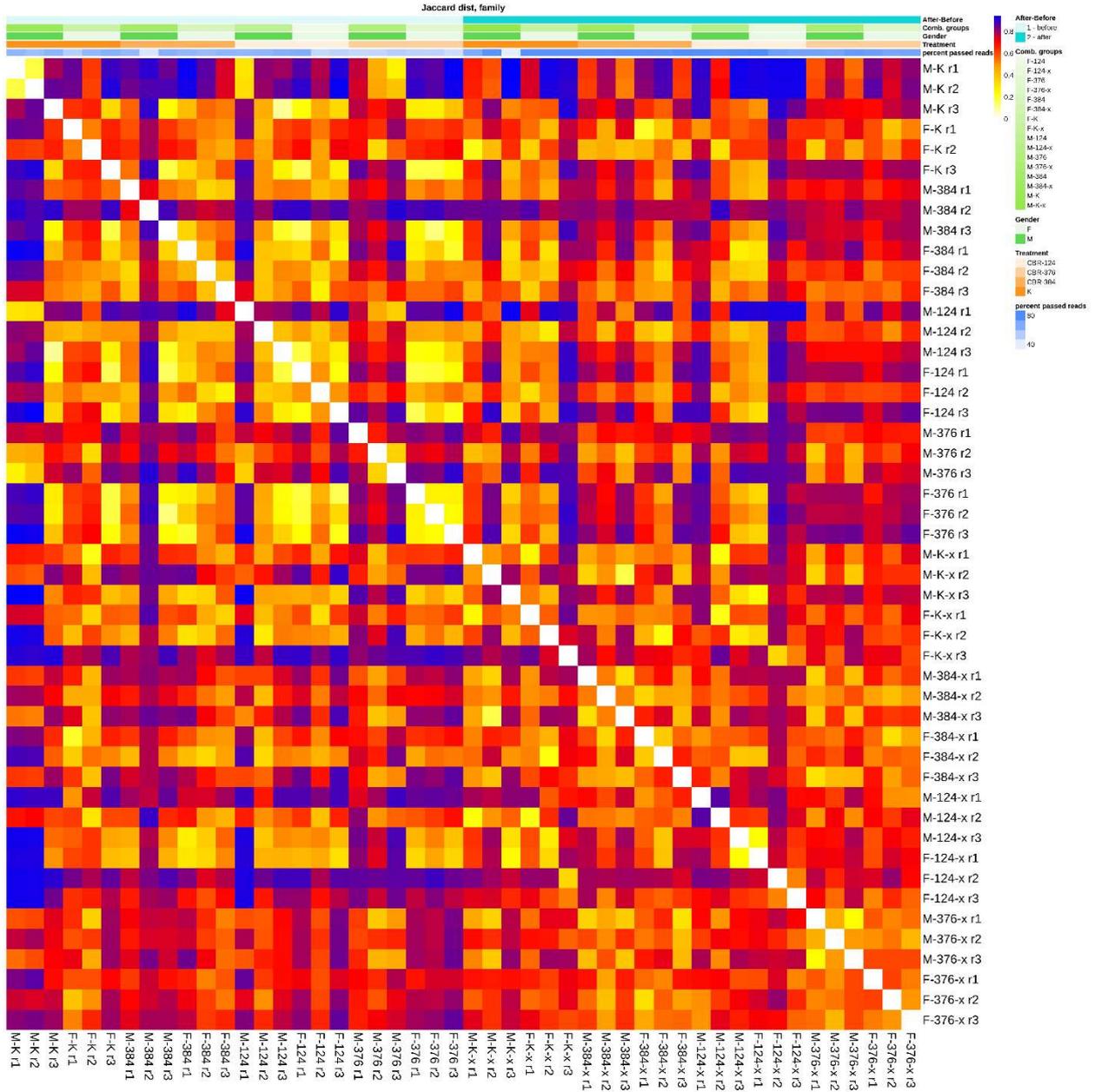
Таблица Б.1 – Индексы α -разнообразия на различных таксономических уровнях.

Контроль												
Индекс разнообразия	филум						семейство					
	до		после		t-test p-value	Mann-Wh. p-value	до		после		t-test p-value	Mann-Wh. p-value
	M	SEM	M	SEM			M	SEM	M	SEM		
Шеннон	0,9	0,1	0,7	0,1	0,2	0,3	1,3	0,1	1,6	0,1	0,03	0,09
Симпсон	0,4	0,0	0,4	0,1	0,6	0,8	0,5	0,1	0,7	0,0	0,08	0,2
Chao1	8,7	0,7	8,2	0,3	0,5	0,4	30,8	2,7	31,3	5,4	0,9	0,9
ACE	9,2	0,8	8,2	0,3	0,3	0,3	30,2	2,6	30,0	4,9	1	0,7
CBR-384												
Индекс разнообразия	филум						семейство					
	до		после		t-test p-value	Mann-Wh. p-value	до		после		t-test p-value	Mann-Wh. p-value
	M	SEM	M	SEM			M	SEM	M	SEM		
Шеннон	1,0	0,1	0,8	0,0	0,3	0,4	1,7	0,2	1,7	0,1	0,7	0,5
Симпсон	0,5	0,1	0,5	0,0	0,9	0,9	0,7	0,1	0,7	0,0	0,6	1,0
Chao1	8,8	0,6	8,7	0,6	0,9	0,8	34,7	3,9	35,8	2,0	0,8	1,0
ACE	8,9	0,6	9,0	0,8	0,9	0,9	34,4	3,9	34,6	1,6	1,0	1,0
CBR-124												
Индекс разнообразия	филум						семейство					
	до		после		t-test p-value	Mann-Wh. p-value	до		после		t-test p-value	Mann-Wh. p-value
	M	SEM	M	SEM			M	SEM	M	SEM		
Шеннон	1,0	0,1	0,6	0,1	0,004	0,004	1,3	0,1	1,6	0,1	0,08	0,09
Симпсон	0,5	0,0	0,3	0,1	0,01	0,04	0,5	0,1	0,7	0,0	0,1	0,2
Chao1	8,0	0,4	8,7	0,2	0,2	0,2	24,2	3,2	41,2	5,7	0,03	0,02
ACE	8,0	0,4	8,7	0,2	0,1	0,1	24,0	3,1	37,1	3,5	0,02	0,02
CBR-376												
Индекс разнообразия	филум						семейство					
	до		после		t-test p-value	Mann-Wh. p-value	до		после		t-test p-value	Mann-Wh. p-value
	M	SEM	M	SEM			M	SEM	M	SEM		
Шеннон	0,8	0,1	1,1	0,0	0,04	0,06	1,2	0,2	2,1	0,1	0,0008	0,002
Симпсон	0,5	0,1	0,5	0,0	0,1	0,1	0,5	0,1	0,8	0,0	0,007	0,02
Chao1	6,8	0,5	8,3	0,3	0,03	0,05	16,3	2,6	39,1	2,0	5,15E-05	0,002
ACE	6,8	0,5	8,4	0,4	0,03	0,04	16,4	2,5	38,4	1,7	6,11E-05	0,002

ПРИЛОЖЕНИЕ В

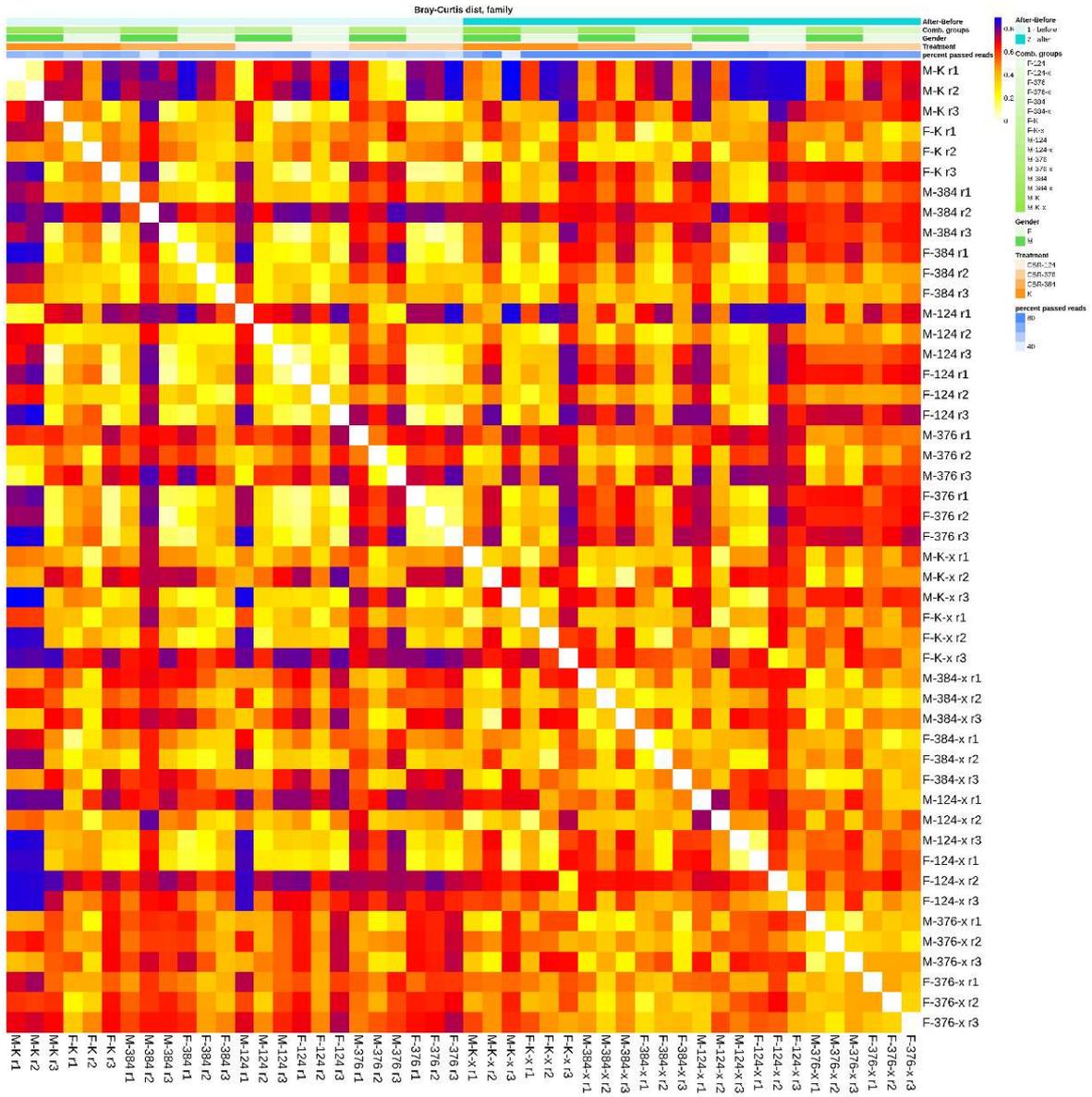


A



Б

Рисунок В.1 – Тепловые карты индекса Жаккара на уровне филумов (А) и семейств (Б).



Б

Рисунок В.2 – Тепловые карты индекса Брея-Кертиса на уровне филумов (А) и семейств (Б).