

*На правах рукописи*

БЕЗМАТЕРНЫХ КСЕНИЯ ВИКТОРОВНА

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

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пермь – 2018

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

**Научный руководитель**

доктор биологических наук

**Смирнова Галина Васильевна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, начальник отдела препаратов бактериотерапии филиала АО «НПО «Микроген» в г. Перми «Пермское НПО «Биомед»

**Несчисляев Валерий Александрович**

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

**Годовалов Анатолий Петрович**

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11)

Защита состоится «01» февраля 2019 г. в «\_\_: \_\_» на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: +7(342)2809211.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.ed.gov.ru>) и на сайте «ИЭГМ УрО РАН» (<http://www.iegm.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте института (<http://www.iegm.ru>).

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Максимова  
Юлия Геннадьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

Масштабные эпидемиологические исследования, проводимые с начала 1990-х годов, показали, что диета, богатая ПФ, оказывает положительное влияние на здоровье человека (Crozier, 2009). ПФ и ЭС обладают защитным, корректирующим и тонизирующим эффектом, проявляя гепатопротекторные, иммунопротекторные и противодиабетические свойства и выступая как адаптогены (Báthori *et al.*, 2008; Fraga *et al.*, 2010). Считается, что в основе положительного влияния этих соединений лежит их антиоксидантная активность (АОА), в частности способность к связыванию радикалов и редокс-активных металлов, а также их модулирующее действие на редокс-статус клеток и активность стрессовых регулонов (López-Alarcón, Denicola, 2013). В то же время в аэробных условиях полифенолы могут подвергаться аутоокислению с образованием АФК, то есть выступать в качестве прооксидантов и производить цитотоксический и мутагенный эффект (Tang, Halliwell, 2010). Следует отметить, однако, что при прохождении по ЖКТ значительная часть полифенолов не всасывается в кровь или подвергается превращению в различные производные. В итоге концентрация редокс-активных ПФ в плазме не превышает наномолярного уровня, что делает маловероятным их непосредственное участие в прямом антиоксидантном действии на клетки человека и животных (Tang, Halliwell, 2010). В отличие от клеток млекопитающих, микробиота кишечника, которая в последние годы рассматривается как важный метаболический орган (Dueñas *et al.*, 2015), может прямо контактировать с достаточно высокими концентрациями немодифицированных ПФ и ЭС и выступать как вероятный посредник их положительного влияния на здоровье. Исследования, посвященные воздействию полифенолов на микроорганизмы, связаны в основном с изучением их бактерицидного и мутагенного действия (Cushnie, Lamb, 2005). Данные о влиянии эдистероидов на бактерии крайне ограничены. Известно только, что они не оказывают отрицательного воздействия на ассоциации микроорганизмов, обитающих в кишечнике (Тимофеев, 2006). Работы сотрудников лаборатории физиологии и генетики «ИЭГМ УрО РАН» показали, что некоторые флавоноиды и таннины, ряд экстрактов лекарственных растений, зеленый и черный чай способны активировать экспрессию антиоксидантных регулонов и влиять на устойчивость бактерий *E. coli* к окислительному стрессу (Oktyabrsky *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2009, 2010, 2012; Samoilova *et al.*, 2014). Однако в целом характер воздействия полифенолов и эдистероидов на стрессовые регулоны и механизм их антиоксидантного действия остается недостаточно изученным.

Актуальность исследования эффектов биологически активных соединений на микробиоту кишечника возрастает в связи с вероятностью их модулирующего влияния на чувствительность бактерий к антибиотикам. В последнее десятилетие предложена гипотеза, согласно которой окислительный стресс является единым механизмом гибели клеток при действии различных антибиотиков (Belenky *et al.*, 2015). Показано, что хелатор железа дипиридил, а также антиоксиданты тиомочевина, аскорбиновая кислота и глутатион повышают устойчивость бактерий к действию ряда антибиотиков, а делеции антиоксидантных генов *katG*, *katE*, *sodC* и *ahpC*

увеличивают чувствительность к фторхинолонам, аминогликозидам и  $\beta$ -лактамам (Goswami *et al.*, 2006, 2007; Kohanski *et al.*, 2007; Wang, Zhao, 2009). Несмотря на интенсивную критику гипотезы (Ezraty *et al.*, 2013; Keren *et al.*, 2013; Liu, Imlay 2013), она продолжает вызывать большой интерес в связи с потенциальной возможностью усиления бактерицидной активности антибиотиков путем воздействий, повышающих уровень АФК. Поскольку полифенолы и экдистероиды могут проявлять антиоксидантные и прооксидантные свойства, выяснение характера их взаимодействия с антибиотиками приобретает большую актуальность. В целом, независимо от мишени и механизма их воздействия изучение влияния полифенолов и экдистероидов в составе продуктов и пищевых добавок на толерантность бактерий к антибиотикам представляет большой теоретический и практический интерес, поскольку может существенно влиять на эффективность антибиотикотерапии.

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

**Основные задачи исследования:**

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

**Научная новизна.** Впервые с использованием химических тестов и бактерий *E. coli* в качестве биологической тест-системы проведено комплексное изучение АОА исследуемых субстанций. Установлено, что наибольший протекторный эффект в условиях окислительного стресса производят субстанции, содержащие полифенолы с высокой хелатирующей активностью и способностью к аутоокислению с образованием АФК. Тролокс, ресвератрол и 20-гидроксиэкдизон (20E), которые обладали высокой антирадикальной активностью, но демонстрировали низкую хелатирующую и прооксидантную способность в химическом тесте, не проявляли антиоксидантных свойств в микробной тест-системе.

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

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

активность канамицина и стрептомицина. 20E не изменял чувствительность к цефотаксиму, усиливал эффект низкой дозы цiproфлоксацина и повышал толерантность к канамицину, стрептомицину и высоким дозам цiproфлоксацина. Сложный характер влияния субстанций на действие антибиотиков, по-видимому, опосредуется совокупностью специфических и неспецифических механизмов, среди которых ведущую роль играет их влияние на скорость роста и индукцию защитных систем бактерий.

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

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

#### **Положения, выносимые на защиту:**

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

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

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

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

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.**

Работа выполнена в Лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН» в соответствии с планом НИР «ИЭГМ УрО РАН» и соответствует направлению исследований по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» (номер госрегистрации 01201353249). Исследования поддержаны грантом по интеграционному проекту № 12-И-4-2072 «Ресурсный и биотехнологический потенциал растений Урала и сопредельной территории европейского северо-востока России – продуцентов важнейших групп биологически активных веществ», грантом РФФИ-Урал № 14-04-96031 «Влияние экстрактов лекарственных растений на устойчивость бактерий к антибиотикам в биофильмах», грантом УМНИК № 8970ГУ/2015 «Разработка микробной тест-системы для оценки антиоксидантных и адаптогенных свойств биологически активных соединений», грантом РФФИ № 16-04-00762 «Изучение взаимосвязи между скоростью роста, редокс-статусом и устойчивостью к стрессам у бактерий *Escherichia coli*», грантом Президента РФ МК-3376.2018.4 «Исследование действия биологически активных веществ растительного происхождения на молекулярно-генетические механизмы регуляции биопленкообразования у кишечных бактерий».

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

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования** – бактерии *Escherichia coli* и две группы биологически активных субстанций. Первая группа включает соединения полифенольной природы (кверцетин, ресвератрол, биодобавка «Трансверол», красное виноградное вино и экстракт кожицы красного винограда), вторая группа представлена экистероидсодержащими препаратами (20-гидроксизидон, биодобавка «Серпистен», экстракты серпухи венценосной и пажитника сенного).

**Бактериальные штаммы.** В работе использовались бактерии родительского штамма *Escherichia coli* BW25113 и созданные на его основе штаммы, несущие слияния промоторов генов *sodA* (Mn-супероксиддисмутаза, NM3001), *sulA(sfiA)* (ингибитор клеточного деления, NM3011), *katG* (каталаза-гидропероксидаза НРІ, NM3021), *katE* (каталаза НРІІ, NM3031) и *rpoS(katF)* (сигма-фактор RpoS, NM3041) со структурным геном *lacZ*, кодирующим β-галактозидазу. Штаммы были сконструированы в ЛФГМ «ИЭГМ УрО РАН» методами трансформации плазмид или трансдукции с фагом P1.

**Среды и условия культивирования.** Бактерии выращивали на минимальной среде M9 (Miller, 1972) с добавлением 0.15% глюкозы, 0.2% казаминовых кислот и тиамин (10 мкг/мл). Селективный отбор бактерий, несущих определенные слияния, осуществляли с помощью антибиотиков, к которым устойчив исследуемый штамм.

Клетки из ночной культуры центрифугировали и переносили в колбы объемом 250 мл, содержащие 100 мл среды M9, до начальной оптической плотности (optical density) при длине волны 600 нм  $OD_{600} = 0.1$  и выращивали в термостатируемом орбитальном шейкере (Россия) при 150 об/мин и температуре 37°C. Культуру в экспоненциальной фазе роста ( $OD_{600} = 0.3$ ) центрифугировали и ресуспендировали в 8 мл среды M9. В ячейки планшета добавляли по 5 мкл исследуемых экстрактов, 5 мкл концентрированных клеток и среду M9 до общего объема 200 мкл. Планшеты инкубировали на термошейкере ELMi Ltd Sky Line ST-3L (Латвия) при 150 об/мин и температуре 37°C 20 мин (предобработка), измеряли оптическую плотность и в опытные ячейки вносили H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или антибиотики ципрофлоксацин, канамицин, стрептомицин и цефотаксим, и в течение 70 мин следили за ростом по изменению  $OD_{600}$ . Оптическую плотность измеряли на микропланшетном спектрофотометре BioRad xMark™ (США) с общим объемом в ячейке 200 мкл.

### **Определение устойчивости бактерий к стрессовым воздействиям.**

Удельную скорость роста культуры ( $\mu$ ) определяли по формуле:

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

Индекс АОА рассчитывали как отношение удельной скорости роста бактерий ( $\mu$ ), предобработанных экстрактами, к удельной скорости роста без предобработки через 30 мин после добавления  $H_2O_2$ :  $\mu_2$  экстракта  $\times \mu_1$  контроля /  $\mu_1$  экстракта  $\times \mu_2$  контроля, где  $\mu_1$  и  $\mu_2$  – удельная скорость роста бактерий до и после добавления  $H_2O_2$ , соответственно.

Колониеобразующую способность определяли через 0, 30 и 70 мин после добавления антибиотика по модифицированной методике (Методы общей бактериологии, 1983). Готовили 10-кратные разведения в физиологическом растворе, затем капли по 10 мкл высевали на чашки Петри с 1.5% LB-агаром.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибиотиков измеряли в планшетах методом серийных разведений на среде М9 с добавлением 0.15% глюкозы, 0.2% казаминовых кислот и тиамина (10 мкг/мл).

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

**Определение антиоксидантных свойств исследуемых препаратов.** Радикал-связывающую активность (РСА) определяли по способности препаратов связывать стабильные радикалы 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH $\cdot$ ) (Shyur *et al.*, 2005). Хелатирующую способность (ХС) оценивали методом, основанном на способности ингибировать реакцию образования комплекса феррозин- $Fe^{2+}$  (Kim *et al.*, 2005).

**Содержание полифенолов и экистероидов.** Общее содержание ПФ измеряли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Folin-Ciocalteu. Содержание отдельных ПФ и ЭС определяли методом ВЭЖХ.

**Измерение скорости продукции перекиси водорода исследуемыми препаратами** осуществляли высокочувствительным спектрофлуориметрическим методом с красителем Amplex Red и пероксидазой хрена (Seaver, Imlay, 2001).

**Получение экстрактов растений.** Экстракты пажитника сенного *Trigonella foenum-graecum*, серпухи венценосной *Serratula coronata* L. и готовый препарат Серпистен были предоставлены сотрудниками лаборатории биохимии и биотехнологии растений Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Серпистен получен из надземных частей серпухи венценосной и представляет собой смесь в соотношении 8:1 экистероидов 20-гидроксиэкизона (20E) и инокостерона (In), являющегося структурным изомером 20E. Красное виноградное вино «PRIOS» (Испания) упаривали на роторном испарителе IKA RV10 (Германия) и лиофильно высушивали. Сухую кожуцу красного винограда размалывали и экстрагировали раствором этиловый спирт : вода в соотношении 4:1 (v/v) на ультразвуковой водяной бане (Elmasonic, Германия) при температуре 60°C. Объединенный экстракт упаривали на роторном испарителе и лиофильно высушивали.

**Измерение парциального давления кислорода** в среде культивирования определяли полярографическим методом с использованием электрода Кларка (Mettler Toledo, Швейцария) и комплекта измерительной аппаратуры NBS «BioFlo 110».

**Изменение мембранного потенциала** определяли с помощью проникающего флуоресцентного красителя DiBAC $_4$ (3) (Wickens *et al.*, 2000) с использованием микроскопа Leica DM2000.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Состав, антиоксидантные и прооксидантные свойства биологически активных субстанций.** При определении суммарного содержания ПФ в исследуемых препаратах наибольший уровень был обнаружен в биодобавке Трансерол, наименьший – в биодобавке Серпистен. Содержание ПФ в экстрактах значительно различалось, снижаясь в следующем порядке: вино >

кожица винограда > пажитник > серпуха. Определение индивидуальных ПФ и ЭС методом ВЭЖХ показало, что вино и виноградная кожица содержали примерно одинаковое количество ресвератрола (81.5 и 75.9 мкг/г сух. веса соответственно), но существенно отличались по уровню кверцетина, которого в экстракте кожицы было в 2 раза больше, чем в экстракте красного вина (55.1 и 115.6 мкг/г сух. веса соответственно). Помимо ресвератрола и кверцетина, в экстрактах были обнаружены другие фенольные соединения. Концентрация 20Е в экстракте серпухи составляла 15 мкг/г сух. веса. Максимальный уровень 20Е (254 мкг/г сух. веса) наблюдался в серпистене.

Максимальную РСА и соответственно минимальное значение  $IC_{50}$  (концентрация, при которой исследуемый образец связывает 50% свободных радикалов DPPH<sup>•</sup>) проявлял кверцетин (Таблица 1). Ресвератрол и комбинированный препарат кверцетина и ресвератрола Трансверол также обладали высокой антирадикальной активностью. РСА 20Е и биодобавки Серпистен была в 50 раз ниже, чем у кверцетина. Среди экстрактов наибольшую РСА имел экстракт вина, который содержал максимальный уровень полифенолов. РСА для экстрактов кожицы винограда, пажитника и серпухи были ниже, чем у вина, что в целом соответствует более низкому содержанию полифенолов в этих экстрактах.

Кверцетин проявлял наибольшую хелатирующую способность и соответственно минимальное значение  $EC_{50}$  (концентрация, при которой исследуемый образец связывает 50%  $Fe^{2+}$ ) (Таблица 1). Ресвератрол не обладал ХС. Трансверол был в 10 раз менее активен, чем кверцетин. ХС экидистероидов значительно уступала ХС полифенолов. Все экстракты проявляли меньшую способность хелатировать  $Fe^{2+}$ , чем кверцетин, но были активнее, чем экидистероиды. Наибольшую ХС среди экстрактов показал экстракт кожицы винограда, далее по степени убывания активности располагались экстракты вина, пажитника и серпухи.

Таблица 1. Радикал-связывающая ( $IC_{50}$ ), хелатирующая ( $EC_{50}$ ) и прооксидантная активность исследуемых препаратов.

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

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

В аэробных условиях многие редокс-активные соединения способны к аутоокислению с образованием АФК. Для оценки прооксидантной активности исследуемых препаратов мы измеряли скорость продукции  $H_2O_2$  (Таблица 1). Максимальной способностью к образованию  $H_2O_2$  обладал кверцетин, по сравнению с которым трансверол и ресвератрол были, соответственно, в 10.1 и 22.6 раза менее активны. 20Е, тролокс и дипиридил не проявляли способности к аутоокислению. Среди экстрактов максимальную скорость продукции  $H_2O_2$  (всего на 10% меньше, чем у кверцетина) показал экстракт вина, содержащий наибольшее количество полифенолов. Далее в порядке убывания располагались экстракт виноградной кожицы, пажитника и серпухи. Серпистен, содержащий наименьшее количество полифенолов среди изученных препаратов, проявлял самую



низкую способность к аутоокислению.

Таким образом, нами впервые было проведено комплексное изучение антирадикальных, хелатирующих и прооксидантных свойств исследуемых препаратов с учетом качественного и количественного состава полифенолов и экдистероидов, что способствует лучшему пониманию механизмов воздействия биологически активных соединений на растущие культуры бактерий.

**Изучение влияния исследуемых препаратов на растущие культуры бактерий *E. coli*.** В работе использовались концентрации препаратов, которые не оказывали бактерицидного действия на *E. coli*: ДМСО – 25 мкл/мл, экстракты вина – 3.6 мг/мл, кожицы винограда – 3.8 мг/мл, серпухи и пажитника – 0.4 мг/мл, трансверол – 160 мкг/мл, серпистен – 0.08 мг/мл, 20E – 0.1 мг/мл (0.2 мМ), тролокс – 0.03 мг/мл (0.1 мМ), дипиридил – 0.02 мг/мл (0.1 мМ). Действие ресвератрола и кверцетина было изучено в диапазоне концентраций 1-100 и 1-40 мкг/мл соответственно. ДМСО использовался в качестве контроля, поскольку служил растворителем для исследуемых препаратов. В большинстве случаев инкубация бактерий с исследуемыми соединениями приводила к некоторому ингибированию удельной скорости роста ( $\mu$ ). Максимальная разница с контролем наблюдалась через 50 мин культивирования. Наибольшее ингибирование вызывали дипиридил (на 43%) и ресвератрол при максимальной дозе 100 мкг/мл (на 35%).

Снижение скорости роста бактерий при добавлении кверцетина сопровождалось дозозависимым торможением дыхания, которое регистрировалось по повышению  $pO_2$  в среде.

С использованием потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя DiBAC<sub>4</sub>(3), мы проследили за изменением мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) *E. coli* при внесении 1-40 мкг/мл кверцетина и 1-100 мкг/мл ресвератрола в среду культивирования. Отрицательно заряженные молекулы красителя не могут проникать в нормальные клетки вследствие отрицательного заряда с внутренней стороны мембраны, поэтому клетки, окрашенные DiBAC<sub>4</sub>(3), можно рассматривать как деполяризованные. Через 10 мин после внесения ДМСО (контрольные условия) количество флуоресцирующих клеток, утративших мембранный потенциал, возросло в 2 раза с последующим возвращением к исходному уровню в течение 60 мин. Добавление кверцетина или ресвератрола вызывало дополнительное падение мембранного потенциала, которое имело дозозависимый характер (Рисунок 1а, б).

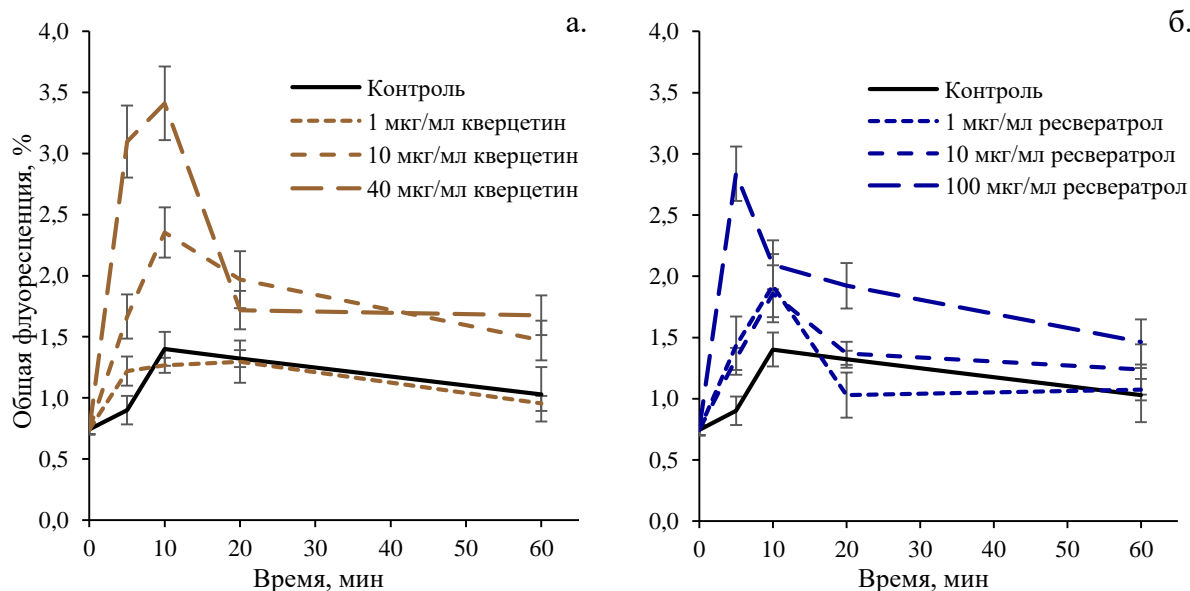


Рисунок 1. Изменение доли клеток *E. coli* BW25113, окрашенных DiBAC<sub>4</sub>(3), утративших мембранный потенциал, от общего числа клеток. а – 1-40 мкг/мл кверцетин; б – 1-100 мкг/мл ресвератрол.

Максимальные изменения по сравнению с контролем наблюдались через 5 мин после внесения 40 мкг/мл кверцетина и 100 мкг/мл ресвератрола, когда количество клеток, утративших мембранный потенциал, возросло в 3.4 и 3.2 раза соответственно. Через 20 мин инкубации доля флуоресцирующих клеток снижалась, но продолжала оставаться повышенной в течение всего времени культивирования. На рисунке 2 показано увеличение числа деполяризованных

(флуоресцирующих) клеток через 5 мин после внесения кверцетина в среду.

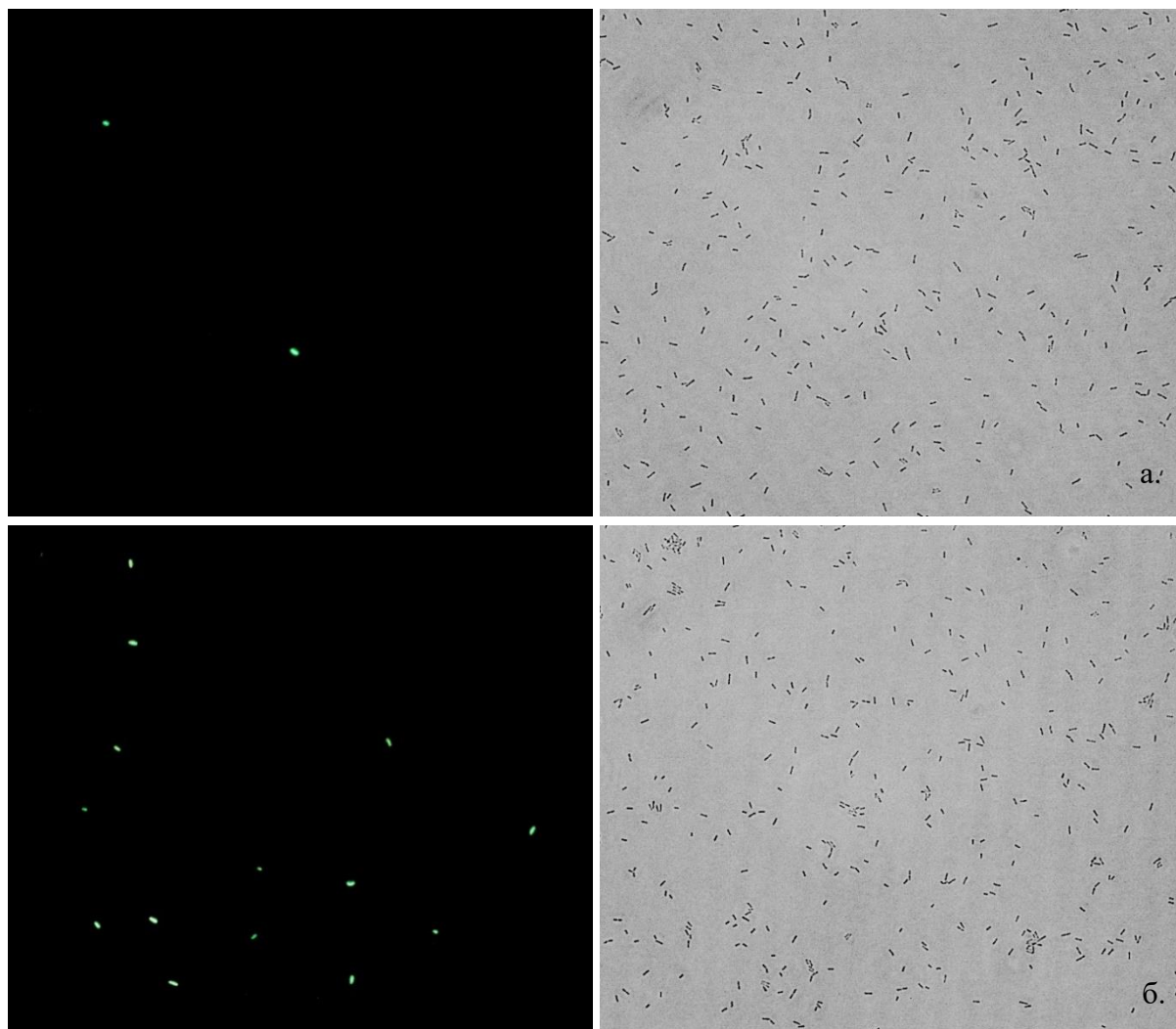


Рисунок 2. Доля флуоресцирующих, утративших мембранный потенциал, клеток *E. coli* от общего числа клеток. а – в контроле; б – через 5 мин экспозиции к 40 мкг/мл кверцетина.

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

**Влияние исследуемых препаратов на экспрессию стрессовых регулонов.** Биологическая активность различных соединений и их смесей может проявляться путем модуляции активности генов, входящих в состав стрессовых регулонов. В наших экспериментах изучалось влияние исследуемых препаратов на экспрессию генов *katG*, *katE*, *rpoS(katF)*, *sodA* и *sulA(sfIA)* путем измерения активности  $\beta$ -галактозидазы в клетках, несущих слияния промоторов этих генов с геном *lacZ*. У бактерий *E. coli* в логарифмической фазе роста экспрессия гена *katG*, кодирующего каталазу НРІ, индуцируется в ответ на повышение концентрации перекиси водорода под контролем транскрипционного регулятора OxyR (Storz *et al.*, 1990). В стационарной фазе экспрессия гена *katG* контролируется глобальным регулятором общего стрессового ответа RpoS (Ivanova *et al.*, 1994). Под контролем регулятора RpoS находится также ген *katE*, кодирующий каталазу НРІІ. Регуляция транскрипции самого гена *rpoS*, кодирующего сигма-фактор RpoS, носит сложный характер и находится под контролем других глобальных транскрипционных факторов (Lange, Hengge-Aronis, 1994; Hengge-Aronis, 2002). Экспрессия гена *sodA*, кодирующего Mn-супероксиддисмутазу, регулируется с участием шести глобальных транскрипционных регуляторов и индуцируется под контролем SoxRS в присутствии соединений, генерирующих супероксид (Touati, 1997). Ген *sulA*, кодирующий ингибитор клеточного деления, входит в SOS-регулон, индуцируется при

повреждении ДНК и контролируется регуляторными белками RecA и LexA (Simmons *et al.*, 2008).

Мониторинг экспрессии генов *katG* и *sodA*, кодирующих каталазу НРІ и Мп-супероксиддисмутазу соответственно, показал, что наиболее выраженный индуцирующий эффект наблюдался в клетках, обработанных экстрактами вина и кожицы винограда, меньший эффект оказывали экстракты пажитника и серпухи. В культурах, обработанных высокими дозами кверцетина и ресвератрола, индукция была в пределах 20-30%. Серпистен и 20Е не оказывали влияния на экспрессию *katG* и *sodA*. Обнаружена высокая степень корреляции между количеством полифенолов в изучаемых экстрактах и экспрессией генов *katG* и *sodA* ( $r = + 0.98$ ). Поскольку ген *sodA* индуцируется в присутствии соединений, продуцирующих супероксид, можно предположить, что при аутоокислении исследуемых препаратов одновременно с перекисью водорода, являющейся индуктором для гена *katG*, образуется радикал супероксид аниона.

Трансверол, 40 мкг/мл кверцетина и экстракт кожицы винограда приводили к снижению экспрессии гена *katE*, кодирующего каталазу НРІІ, на 24-36%. Среди субстанций, содержащих экистероиды, некоторый ингибирующий эффект на экспрессию гена *katE* производил экстракт пажитника (до 16%). Остальные исследуемые препараты не оказывали влияния.

Дипиридил, экстракты вина, кожицы винограда и пажитника ингибировали экспрессию гена *rpoS*, кодирующего сигма-фактор RpoS, на 30-40%. Напротив, в культурах, обработанных 12 мкг/мл ресвератрола, экспрессия *rpoS::lacZ* поддерживалась на более высоком уровне. Интересно, что, несмотря на то, что ген *katE* входит в RpoS регулон, мы не наблюдали полной аналогии в характере влияния исследуемых препаратов на гены *rpoS* и *katE*. Совпадение эффектов наблюдалось только в случае экстрактов кожицы винограда и пажитника. В остальных случаях эффекты не совпадали или отсутствовали. Причиной может быть сложный характер регуляции уровня белка RpoS, который осуществляется не только на уровне транскрипции гена *rpoS*, но также на уровне трансляции мРНК и протеолиза готового белка.

Наблюдаемая нами у бактерий *E. coli* индукция экспрессии антиоксидантных генов препаратами, богатыми полифенолами, хорошо согласуется с более ранними исследованиями, в которых было показано повышение активности различных антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и др.) в ответ на действие полифенолов в отношении большинства испытанных культур про- и эукариотических клеток (Halliwell, 2008; Oktyabrsky *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2009, 2010, 2012; Alam *et al.*, 2013; Parisi *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2013; Samoilova *et al.*, 2014).

Различные АФК-генерирующие агенты приводят к индукции генов, принадлежащих не только регулонам OxyR и SoxRS, но и SOS-регулону, в состав которого входит ген *sulA* (Imlay, Linn, 1987; Kato *et al.*, 1994). Добавление тролокса и 100 мкг/мл ресвератрола повышало экспрессию гена *sulA(sfiA)*, кодирующего ингибитор клеточного деления, который входит в SOS-регулон. Трансверол и 40 мкг/мл кверцетина, напротив, снижали экспрессию этого гена в 2.3 раза. Все экистероидсодержащие препараты индуцировали ген *sulA*. Наибольшее индуцирующее воздействие проявлял серпистен, который стимулировал экспрессию *sulA::lacZ* в 3.2 раза. Наблюдаемые эффекты исследуемых препаратов на экспрессию гена *sulA(sfiA)* могут быть связаны как с повреждающим действием на ДНК, так и с влиянием на регуляторные сигнальные пути, как это показано для 20Е в эукариотических клетках (Dinan, Lafont, 2006; Hu *et al.*, 2012).

**Антиоксидантное действие исследуемых препаратов на клетки *E. coli*.** Антиоксидантное действие различных соединений на живые организмы определяется их влиянием на продукцию и деструкцию радикалов, на связывание ионов металлов с переменной валентностью и индукцию защитных систем клеток. Мы изучили антиоксидантное действие исследуемых препаратов на растущие культуры *E. coli* в условиях окислительного стресса, вызванного перекисью водорода. Добавление 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводило к резкому снижению удельной скорости роста ( $\mu$ ) бактерий с последующим постепенным ее повышением по мере снижения концентрации перекиси в среде. Предобработка бактерий исследуемыми препаратами модулировала ингибирующий эффект H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на  $\mu$ . Экстракты вина, кожицы винограда, серпухи и пажитника, трансверол, 40 мкг/мл кверцетина и дипиридил значительно снижали бактериостатическое действие перекиси водорода, индекс АОА варьировал от 3.8 до 8.8 (Рисунок 3а, б).

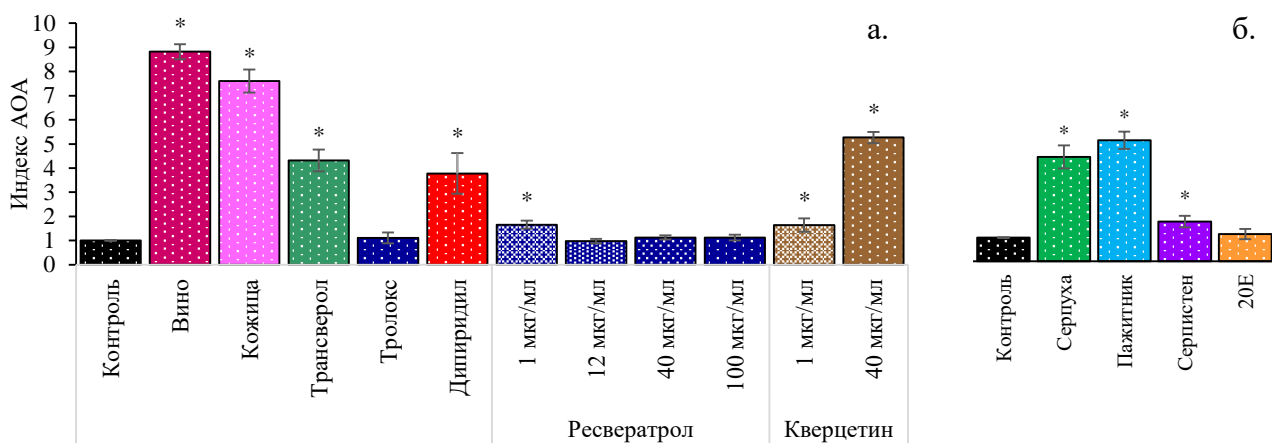


Рисунок 3. Модулирующее действие препаратов, содержащих ПФ (а) или ЭС (б) на значение АОА при экспозиции *E. coli* к 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Остальные субстанции оказывали слабое антиоксидантное действие. Была обнаружена высокая степень корреляции между экспрессией генов *katG* и *soda* в культурах, предобработанных испытуемыми субстанциями, и индексом АОА после внесения 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среду ( $r = + 0.97$  и  $r = + 0.95$  соответственно).

В целом, антиоксидантный эффект субстанций зависел, с одной стороны, от их способности хелатировать внутриклеточное Fe<sup>2+</sup>, предотвращая его участие в реакции Фентона с образованием токсичных ОН• радикалов, с другой стороны, от способности индуцировать стрессовые регулоны, что способствует снижению токсического действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ускорению ее деструкции каталазой.

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

**Влияние препаратов на чувствительность *E. coli* к ципрофлоксацину (ЦИП).** Высокие дозы ресвератрола (40-100 мкг/мл) и дипиридил повышали МИК антибиотика в 2 раза, экстракт вина и виноградной кожицы – в 4 раза. Максимальный эффект проявляли кверцетин и трансверол, повышавшие МИК ЦИП в 16 раз. Действие ЦИП на растущие периодические культуры *E. coli* было изучено при концентрациях: 0.03 (2 МИК), 0.3 (20 МИК) и 3 мкг/мл (200 МИК). Доза 0.03 мкг/мл не ингибировала рост бактерий, 0.3 мкг/мл – снижала  $\mu$  на треть от контроля, 3 мкг/мл – быстро ингибировала  $\mu$  сразу после добавления ЦИП. Экспозиция бактерий к ЦИП приводила к резкому снижению числа колониеобразующих единиц (КОЕ). К концу инкубации с 0.03 мкг/мл ЦИП КОЕ было в 83 раза ниже контроля, более высокие концентрации снижали КОЕ до 77000 раз.

Предобработка *E. coli* трансверолом и 40 мкг/мл кверцетина препятствовала падению  $\mu$ , вызванному ЦИП (3 мкг/мл), в 5 и 7 раз по сравнению с одним антибиотиком. 20E предотвращал резкое падение скорости роста бактерий в течение 30 мин после внесения 3 мкг/мл ЦИП. Напротив, 1 мкг/мл ресвератрола и дипиридил способствовали снижению удельной скорости роста. Характер модифицирующего влияния препаратов на КОЕ в присутствии ЦИП зависел от вида и концентрации препарата и дозы антибиотика. Предобработка *E. coli* экстрактами вина и кожицы винограда, трансверолом и высокими концентрациями кверцетина и ресвератрола производила протекторный эффект, вплоть до полного предотвращения бактерицидного действия 0.03 мкг/мл ЦИП (Рисунок 4а, б). Дипиридил проявлял несколько менее выраженный защитный эффект.

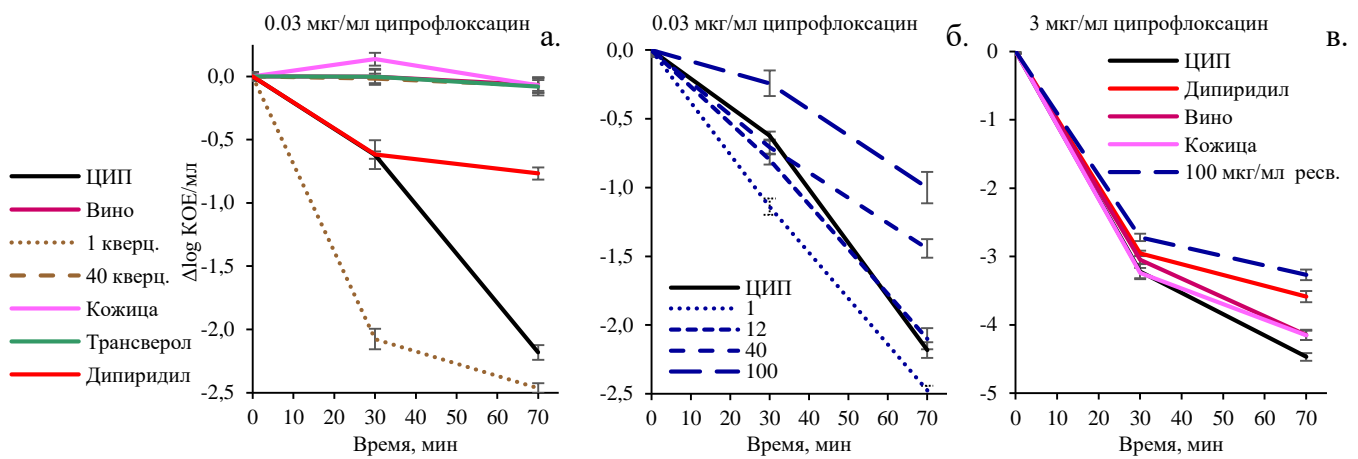


Рисунок 4. Воздействие препаратов на число КОЕ *E. coli* при экспозиции к ципрофлоксацину. а, в – препараты, содержащие ПФ; б – 1-100 мкг/мл ресвератрола.

Напротив, концентрация 1 мкг/мл кверцетина и ресвератрола усиливала действие ЦИП, существенно ускоряя снижение КОЕ. При более высоких концентрациях ципрофлоксацина (0.3 и 3 мкг/мл) предобработка бактерий трансверолом, 40 мкг/мл кверцетина и 100 мкг/мл ресвератрола и хелатором дипиридилем оказывала выраженное защитное действие, увеличивая выживаемость бактерий от 4.5 до 18 раз (Рисунок 4в). В этих условиях экстракты вина и виноградной кожицы производили более слабый протекторный эффект, увеличивая КОЕ в 3 раза.

Предобработка эдистероидсодержащими экстрактами серпухи и пажитника в 3.5 и 4.9 раза ослабляла бактерицидный эффект 0.03 мкг/мл ЦИП. Напротив, 20Е усиливал действие антибиотика, снижая число КОЕ в 4 раза (Рисунок 5а). Интересно, что при увеличении дозы ЦИП (0.3 и 3 мкг/мл), наблюдался защитный эффект 20Е: число КОЕ в культуре с предобработкой было в 4 и 7.5 раз соответственно выше, чем с одним антибиотиком (Рисунок 5б).

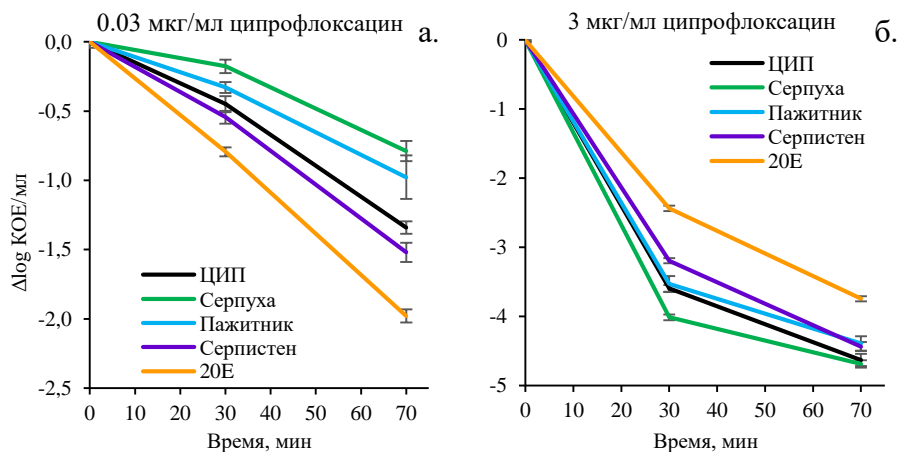


Рисунок 5. Воздействие препаратов, содержащих ЭС, на число КОЕ *E. coli* при экспозиции к ципрофлоксацину: а – 0.03 мкг/мл; б – 3 мкг/мл.

**Влияние препаратов на чувствительность *E. coli* к канамицину (КАН).** Экстракты вина, серпухи и пажитника, дипиридил, 20Е, высокие концентрации ресвератрола и кверцетина, а также трансверол, оказывали слабое защитное действие на бактерии, повышая МИК канамицина в 2 раза. Остальные препараты не влияли на МИК. Добавление 10 мкг/мл (2 МИК) КАН в растущую культуру *E. coli* приводило к постепенному снижению  $\mu$  бактерий в 4.6 раза по сравнению с контролем; доза 40 мкг/мл (8 МИК) резко ингибировала рост и приводила к отрицательным значениям  $\mu$  уже через 50 мин после внесения антибиотика. При этом способность бактерий формировать колонии при 10 мкг/мл КАН снижалась в 85 раз, а при 40 мкг/мл – в 77000 раз.

Предобработка бактерий дипиридилем, трансверолом и высокими концентрациями ресвератрола и кверцетина ослабляла ингибирующее действие 10 мкг/мл антибиотика, повышая  $\mu$  в 2-3 раза. При 40 мкг/мл КАН протекторное действие субстанций было выражено в меньшей

степени, однако ресвератрол и дипиридил предотвращали резкое снижение удельной скорости. Примечательно, что экстракт кожицы винограда усиливал ингибирующее действие обеих доз канамицина. Предобработка бактерий серпистеном также усиливала ингибирующее действие 10 мкг/мл антибиотика, снижая  $\mu$  бактерий в 4.3 раза. При воздействии на культуры 40 мкг/мл КАН, помимо серпистена, ингибирующее влияние оказывали экстракты серпухи и пажитника, снижая  $\mu$  в 2 раза после 30-ти минутной экспозиции. В этих условиях 20Е, напротив, предотвращал вызванное обеими концентрациями канамицина падение скорости роста.

Дипиридил и 100 мкг/мл ресвератрола полностью предотвращали снижение числа КОЕ, вызванное 10 мкг/мл КАН. Менее выраженный протекторный эффект наблюдался при предобработке тролоксом, трансверолом, 12-40 мкг/мл ресвератрола и 40 мкг/мл кверцетина, где число КОЕ увеличивалось в 3-8 раз (Рисунок 6а). При экспозиции к 40 мкг/мл КАН существенное защитное действие сохранялось в случае предобработки бактерий дипиридилом и 100 мкг/мл ресвератрола, трансверол повышал КОЕ в 4 раза (Рисунок 6б). Экстракт виноградной кожицы и низкие концентрации ресвератрола и кверцетина стимулировали снижение числа КОЕ до 22 раз уже через 30 мин экспозиции к 40 мкг/мл канамицина.

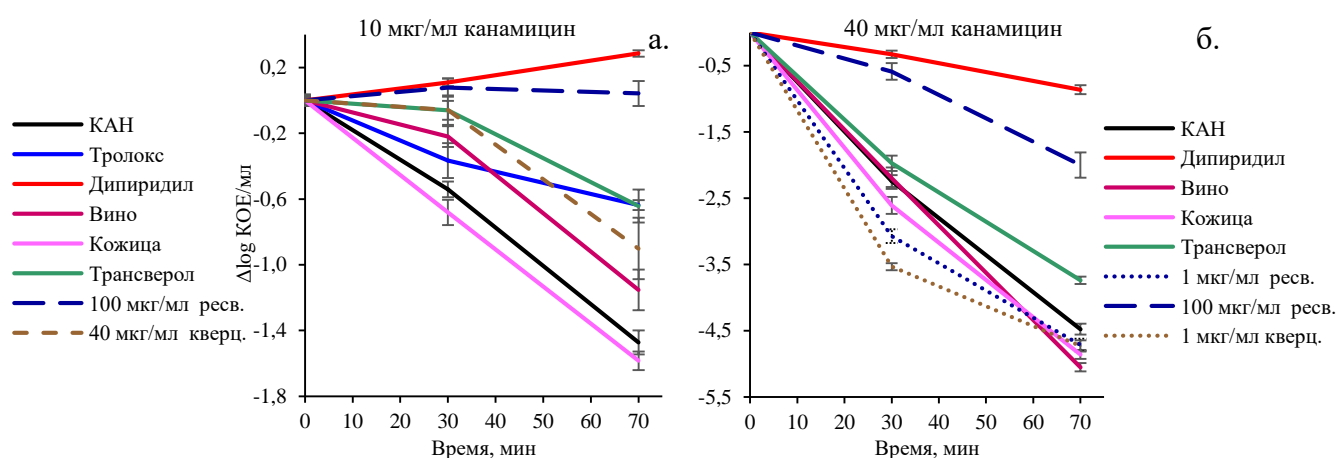


Рисунок 6. Воздействие препаратов, содержащих ПФ, на число КОЕ *E. coli* при экспозиции к канамицину: а – 10 мкг/мл; б – 40 мкг/мл.

В случае культивирования бактерий в присутствии препаратов, содержащих ЭС, было обнаружено, что 20Е полностью защищал *E. coli* от действия 10 мкг/мл КАН и значительно ингибировал падение числа КОЕ в течение 30 мин после внесения 40 мкг/мл КАН (Рисунок 7а, б). В свою очередь, действие 10 и 40 мкг/мл КАН усиливалось в культурах, предобработанных серпистеном и экстрактами серпухи и пажитника. Наиболее выраженный эффект оказывал серпистен, снижая число КОЕ в 2 раза через 70 мин экспозиции к высокой дозе антибиотика.

В целом, во всех тестах (МИК, скорость роста и КОЕ) высокие дозы кверцетина и ресвератрола, трансверол, 20-гидроксиэксдизон и дипиридил оказывали защитное действие против канамицина, что совпадало с эффектом этих соединений при экспозиции бактерий к ципрофлоксацину. Интересно, что низкие дозы кверцетина и ресвератрола вызывали противоположный эффект, усиливая бактерицидное действие обоих антибиотиков. Важной отличительной особенностью является стимуляция бактерицидного действия канамицина серпистеном и экстрактами кожицы винограда, серпухи и пажитника. Ранее повышение бактерицидной активности канамицина отмечалось при предобработке бактерий *E. coli* черным чаем и экстрактами листьев брусники и толокнянки (Samoilova *et al.*, 2014). Примечательно, что 20Е и серпистен, содержащий 20Е в качестве одного из основных компонентов, действовали на активность канамицина противоположным образом. Это указывает на то, что стимуляция бактерицидной активности канамицина серпистеном, а также экстрактами серпухи и пажитника может быть связана с другим экидистероидом (25S-инокостероном), входящим в их состав (Володина и др., 2010).

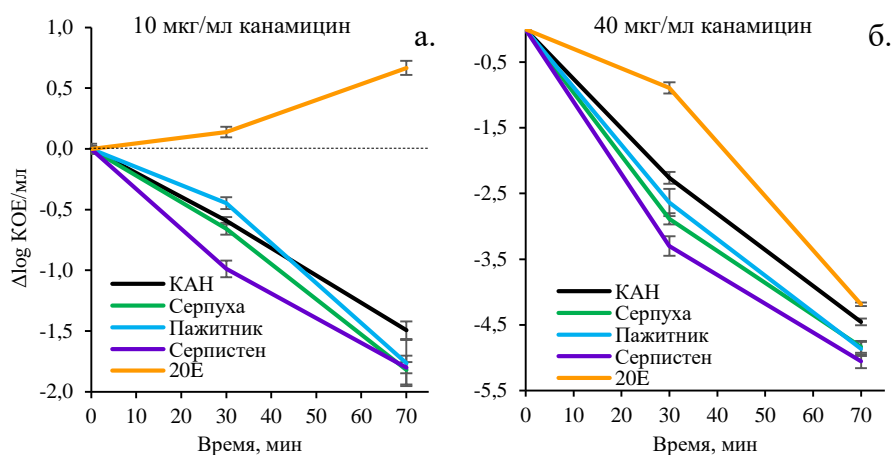


Рисунок 7. Воздействие препаратов, содержащих ЭС, на число КОЕ *E. coli* при экспозиции к канамицину: а – 10 мкг/мл; б – 40 мкг/мл.

### Влияние исследуемых препаратов на чувствительность *E. coli* к стрептомицину (СТР).

Как и в случае канамицина, экстракты вина, серпухи и пажитника, дипиридил, 20Е, кверцетин (40 мкг/мл) и трансверол оказывали слабое защитное влияние, вызывая двукратное повышение МИК стрептомицина. Ингибирующее влияние СТР на  $\mu$  *E. coli* было выражено в несколько меньшей степени, чем у канамицина. Влияние 10 (2 МИК) и 40 мкг/мл (8 МИК) СТР на способность бактерий образовывать колонии было близким к действию аналогичных концентраций КАН.

При экспозиции к стрептомицину сохранялся также выявленный для канамицина характер модифицирующего влияния предобработки исследуемыми препаратами, содержащими полифенолы и экдистероиды. В частности, наблюдалось снижение ингибирующего эффекта 10 и 40 мкг/мл стрептомицина на рост после предобработки бактерий высокими дозами кверцетина и ресвератрола, трансверолом и дипиридилом и, напротив, усиление ингибирования роста в присутствии экстракта кожицы винограда. 20Е оказывал защитное действие на рост бактерий в течение 30 мин экспозиции к обеим дозам СТР. Предобработка серпистеном и экстрактами серпухи и пажитника в этих условиях не влияла на скорость роста.

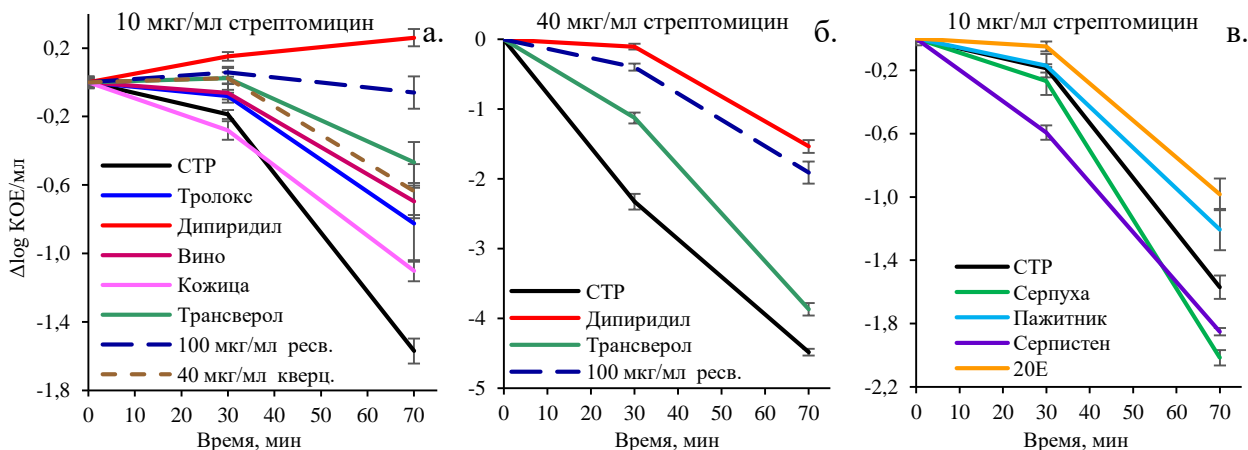


Рисунок 8. Воздействие препаратов, содержащих ПФ (а, б) и ЭС (в), на число КОЕ *E. coli* при экспозиции к стрептомицину: а, в – 10 мкг/мл; б – 40 мкг/мл.

Все испытуемые полифенолсодержащие препараты, кроме низких доз ресвератрола и кверцетина, и дипиридил снижали эффективность бактерицидного действия 10 мкг/мл СТР от 2.5 до 100 раз (Рисунок 8а). При 40 мкг/мл СТР наибольший протекторный эффект оказывали 100 мкг/мл ресвератрола и дипиридил. При этом число КОЕ к концу культивирования возрастало в 750 и 1500 раз соответственно по сравнению с одним антибиотиком. Наблюдалось слабое протекторное действие трансверола, при котором количество КОЕ увеличивалось в 4 раза (Рисунок 8б). Аналогичный эффект на выживаемость оказывал 20Е при экспозиции к 10 мкг/мл СТР (Рисунок 8в). В этих условиях экстракт серпухи и серпистен, напротив, усиливали действие антибиотика,

снижая число КОЕ в 3 и 2.3 раза соответственно. Модифицирующий эффект субстанций при добавлении более высокой дозы стрептомицина был выражен в меньшей степени.

**Влияние исследуемых препаратов на чувствительность *E. coli* к цефотаксиму (ЦЕФ).** Присутствие исследуемых полифенол- и экдистероидсодержащих препаратов слабо влияло на МИК цефотаксима. Обработка экстрактом серпухи, ресвератролом (40 мкг/мл), кверцетином (40 мкг/мл) и трансверолом повышала МИК в 2 раза. Добавление цефотаксима в растущие культуры *E. coli* вызывало резкое ингибирование  $\mu$  и лизис клеток через 23 и 18 мин после внесения в среду дозы 5 (62 МИК) и 10 (125 МИК) мкг/мл соответственно. При этом колониеобразующая способность *E. coli* зависела от концентрации антибиотика и максимально снижалась в 1270 раз через 70 мин экспозиции к 10 мкг/мл ЦЕФ.

Предобработка исследуемыми субстанциями оказывала ярко выраженный модифицирующий эффект на рост бактерий в присутствии цефотаксима. Все полифенолсодержащие препараты, кроме низкой дозы кверцетина, полностью предотвращали или существенно замедляли лизис, вызываемый ЦЕФ (Рисунок 9а). Ресвератрол оказывал дозозависимое протекторное действие на удельную скорость роста *E. coli* (Рисунок 9б). Среди препаратов, содержащих ЭС, предобработка бактерий серпистеном полностью предотвращала лизис, вызываемый 5 мкг/мл ЦЕФ, и замедляла его наступление при более высокой дозе антибиотика (Рисунок 9в). Остальные субстанции не оказывали существенного влияния на  $\mu$ .

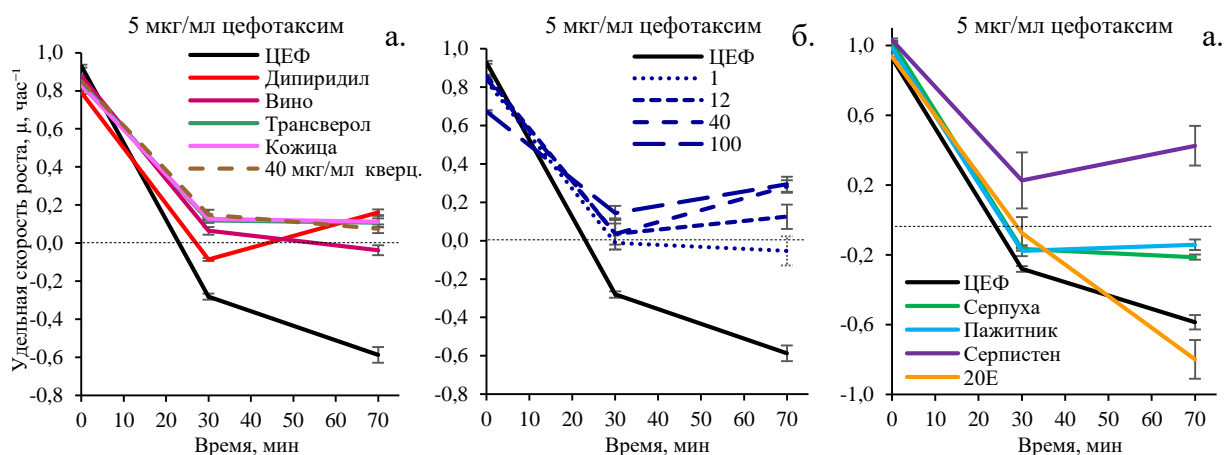


Рисунок 9. Воздействие препаратов на удельную скорость роста *E. coli* при экспозиции к 5 мкг/мл цефотаксима. а – препараты, содержащие ПФ; б – 1-100 мкг/мл ресвератрола, в – препараты, содержащие ЭС.

Предобработка бактерий изученными препаратами в различной степени ингибировала бактерицидное действие ЦЕФ, повышая способность клеток к образованию колоний. Наибольший защитный эффект субстанций наблюдался при экспозиции бактерий к 10 мкг/мл ЦЕФ, когда дипиридил и 100 мкг/мл ресвератрола повышали КОЕ в 25 и 34 раза соответственно (Рисунок 10а, б). Остальные препараты, кроме тролокса и низких концентраций ресвератрола и кверцетина, увеличивали КОЕ от 3 до 9 раз. Протекторное действие ресвератрола имело дозозависимый характер. При экспозиции бактерий к 10 мкг/мл ЦЕФ серпистен повышал КОЕ в 9 раз, (Рисунок 10в). Экстракты серпухи и пажитника оказывали очень слабый протекторный эффект на бактерии. 20E не влиял на колониеобразующую способность *E. coli*.

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



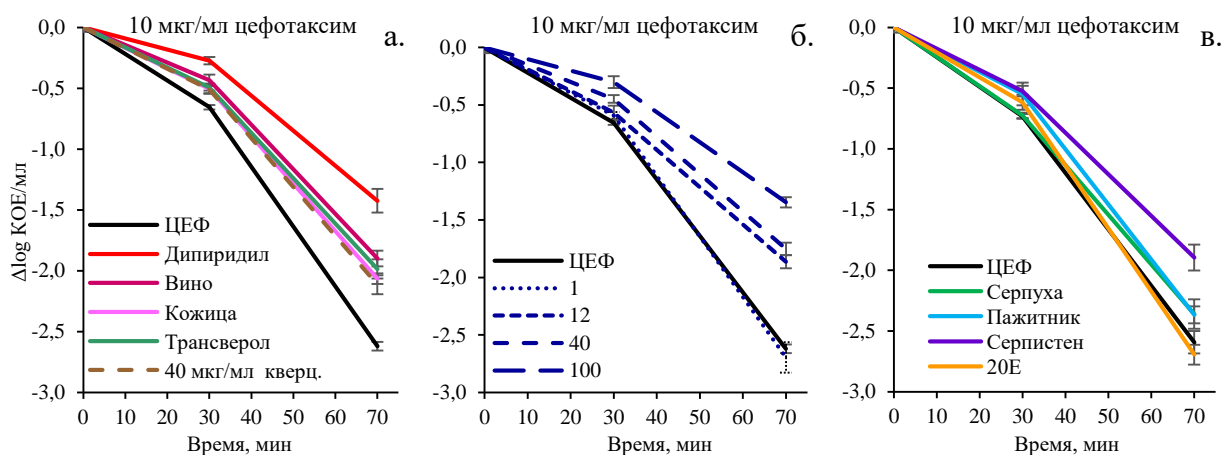


Рисунок 10. Воздействие препаратов на число КОЕ *E. coli* при экспозиции к 10 мкг/мл цефотаксима. а – препараты, содержащие ПФ; б – 1-100 мкг/мл ресвератрола; в – препараты, содержащие ЭС.

**Влияние исследуемых препаратов на экспрессию стрессовых регулонов при действии ципрофлоксацина.** Для изучения роли антиоксидантных систем при формировании толерантности к антибиотикам был проведен мониторинг экспрессии генов *katG*, *sodA*, *katE*, *rpoS*, *sulA*, принадлежащих соответственно к стрессовым регулонам OxyR, SoxRS, RpoS и SOS, при воздействии на бактерии ципрофлоксацина.

Обработка бактерий 0.03 и 0.3 мкг/мл ЦИП не оказывала влияния на экспрессию слияния *katG::lacZ* в течение 70 мин, а доза 3 мкг/мл усиливала экспрессию в 1.5 раза. Наиболее выраженный эффект предобработки субстанциями проявлялся при действии 3 мкг/мл ЦИП. В культурах, растущих с добавлением трансверола и 40 мкг/мл кверцетина, уровень экспрессии был на 21-25% ниже. Напротив, в культурах, предобработанных 12 мкг/мл ресвератрола и экстрактом вина, экспрессия слияния была на 21-28% выше (Рисунок 11а). Экстракты серпухи и пажитника также повышали активность  $\beta$ -галактозидазы в 1.7 и 2 раза соответственно. Серпистен и 20E не оказывали влияние на экспрессию *katG*.

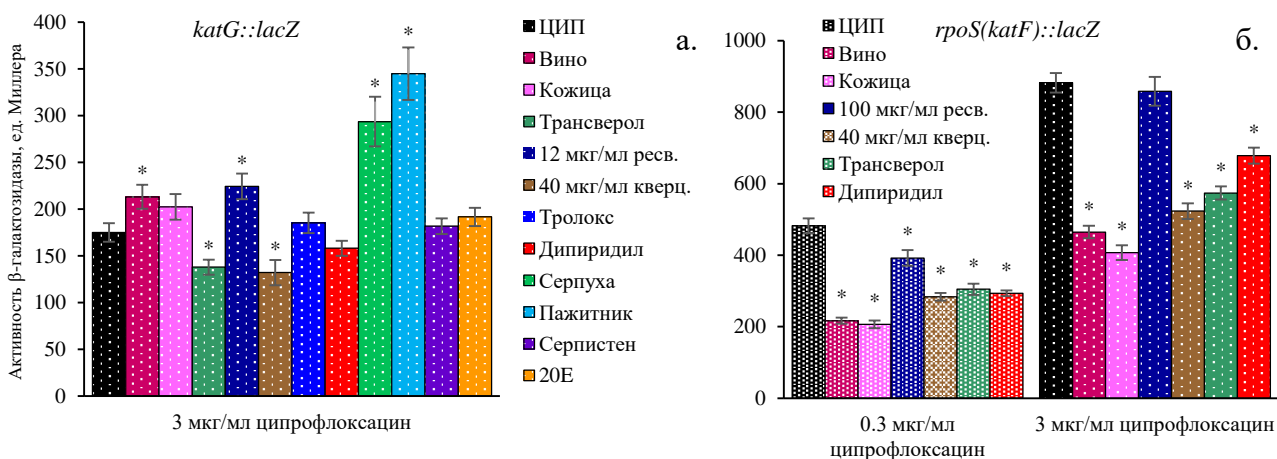


Рисунок 11. Влияние ципрофлоксацина на экспрессию: а – *katG::lacZ*; б – *rpoS(katF)::lacZ* при культивировании с изучаемыми препаратами.

Таким образом, обработка бактерий полифенолами и экстрактами, богатыми полифенолами и экидстероидами, в присутствии ципрофлоксацина могла оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее воздействие на экспрессию гена *katG*.

Ципрофлоксацин вызывал повышение экспрессии *rpoS::lacZ* до 3.5 раз в случае 3 мкг/мл антибиотика, доза 0.03 мкг/мл не оказывала влияния. Поскольку экспрессия *rpoS* повышается при замедлении роста, полученный результат в целом соответствует степени воздействия ципрофлоксацина на скорость роста бактерий. Предобработка *E. coli* экстрактами виноградной кожицы и вина, трансверолом, 40 мкг/мл кверцетина, 100 мкг/мл ресвератрола и дипиридилем приводила к снижению экспрессии слияния на 19-57% через 70 мин после внесения 0.3 или 3 мкг/мл

ЦИП. При этом тролокс, 1 мкг/мл кверцетина и 1-40 мкг/мл ресвератрола не оказывали значимого эффекта (Рисунок 11б). Среди препаратов, содержащих эдистероиды, только экстракт пажитника влиял на активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках, снижая уровень экспрессии в 1.6 и 1.4 раза при экспозиции *E. coli* к 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП соответственно. Следует отметить, что большая часть препаратов, предобработка которыми снижает экспрессию *rpoS* в ответ на экспозицию к цiproфлоксацину, оказывает защитное действие на рост бактерий. Таким образом, причиной модулирующего действия предобработок на экспрессию *rpoS* в присутствии высокой дозы цiproфлоксацина может быть их влияние на скорость роста бактерий.

Активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках, несущих слияние *katE::lacZ*, в ответ на добавление 0.3 и 3 мкг/мл ЦИП повышалась в 1.7 и 3.7 раза соответственно, доза 0.03 мкг/мл не влияла на экспрессию *katE*. Характер изменения экспрессии изучаемого слияния в клетках, предобработанных испытуемыми препаратами, был аналогичен таковому у бактерий, несущих слияние *rpoS::lacZ* (Рисунок 12а). Это может быть следствием того, что ген *katE* находится под контролем регуляторного белка RpoS.

При экспозиции бактерий к цiproфлоксацину, только доза 3 мкг/мл оказывала значительное влияние на экспрессию *sodA::lacZ*, повышая количество  $\beta$ -галактозидазы в клетках в 2.4 раза. Добавление экстрактов виноградной кожицы, вина, серпухи, пажитника, 40 и 100 мкг/мл ресвератрола, дипиридила и 20-гидроксиэкидизона индуцировало экспрессию слияния на 25-50% через 70 мин после внесения антибиотика (Рисунок 12б). Учитывая, что исследуемые субстанции сами оказывали стимулирующее действие на экспрессию гена *sodA*, в этой ситуации наблюдался аддитивный эффект предобработки и антибиотика.

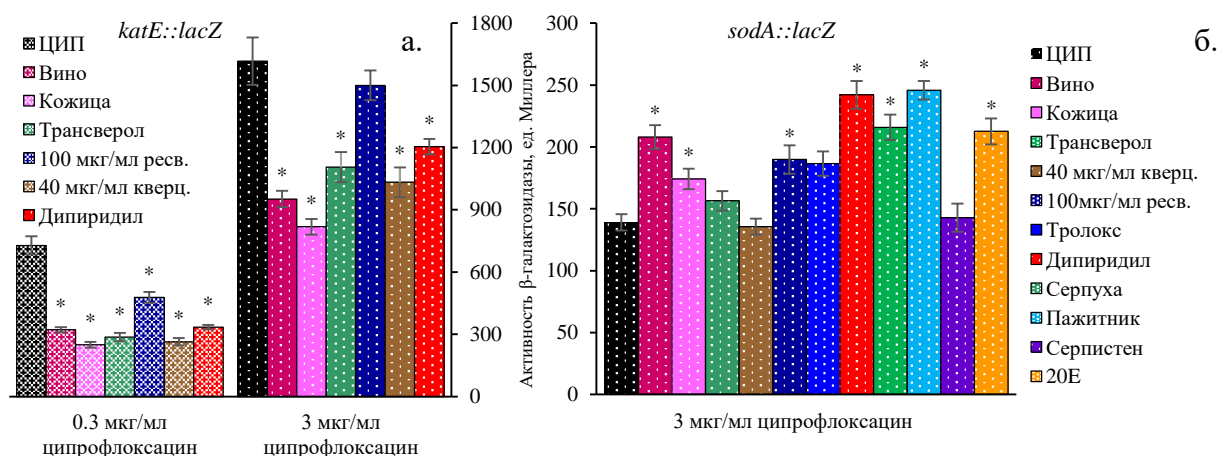


Рисунок 12. Влияние цiproфлоксацина на экспрессию: а – *katE::lacZ*; б – *sodA::lacZ* при культивировании с изучаемыми препаратами.

В наших экспериментах цiproфлоксацин, повреждающий ДНК, индуцировал экспрессию принадлежащего к SOS-регулону гена *sulA*. Максимальный уровень индукции (3.3 раза) наблюдался при концентрации антибиотика 0.3 мкг/мл. Предобработка бактерий экстрактами вина и кожицы винограда, 40 мкг/мл кверцетина, трансверолом и дипиридилем снижала активность  $\beta$ -галактозидазы в 1.4-2 раза (Рисунок 13а). Тролокс, 1-40 мкг/мл ресвератрола и 1 мкг/мл кверцетина, напротив, оказывали аддитивный эффект на экспрессию слияния *sulA(sfiA)::lacZ*. При экспозиции бактерий ко всем изученным концентрациям цiproфлоксацина в присутствии препаратов, содержащих эдистероиды, наблюдалось повышение экспрессии гена *sulA*. Наиболее выраженное воздействие наблюдалось через 30 мин экспозиции клеток к 0.03 мкг/мл ЦИП, когда уровень  $\beta$ -галактозидазы возрастал в 1.8-2.4 раза (Рисунок 13б). Максимальный уровень индукции наблюдался в культуре, предобработанной 20E.

Статистический анализ выявил наличие зависимости между экспрессией изучаемых генов в момент добавления цiproфлоксацина и способностью бактерий формировать колонии. Число КОЕ при экспозиции к 0.03 и 0.3 мкг/мл ЦИП было положительно связано с уровнем индукции антиоксидантных генов *katG* и *sodA* при добавлении фторхинолона. Коэффициент корреляции для гена *katG* варьировал от + 0.52 до + 0.64, для гена *sodA* – от + 0.72 до + 0.77.

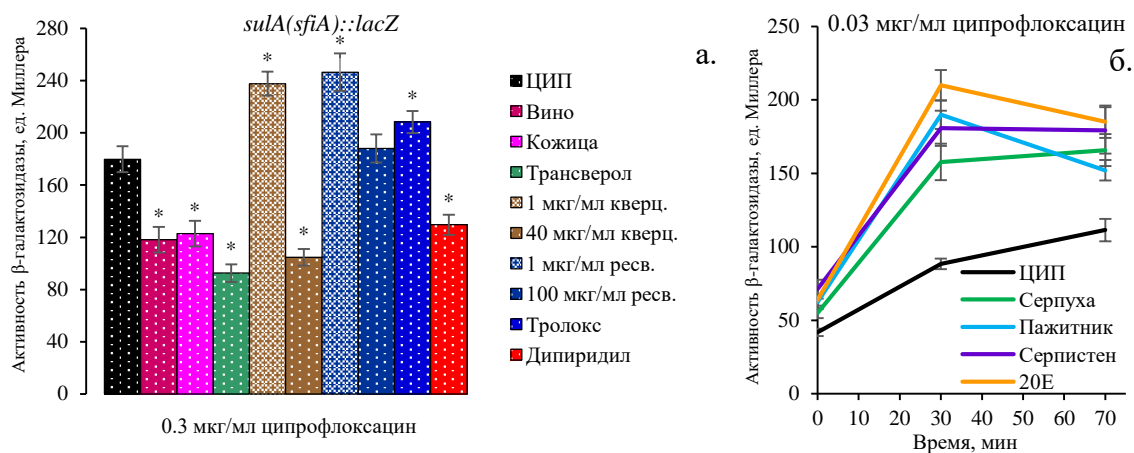


Рисунок 13. Влияние ципрофлоксацина (ЦИП) на экспрессию *sulA(sfIA)::lacZ*, в культурах, предобработанных препаратами, содержащими: а – ПФ; б – ЭС.

Обобщенные данные, характеризующие направление модифицирующего воздействия, представлены в таблице 2. Видно, что предобработка высокими дозами кварцетина (40 мкг/мл) и ресвератрола (100 мкг/мл), трансверолом и дипиридиллом повышала МИК и выживаемость *E. coli* при экспозиции ко всем исследованным антибиотикам. Тролокс оказывал протекторное действие только в случае канамицина (10 мкг/мл), не влияя на эффект остальных антибиотиков. 20E не изменял чувствительность к цефотаксиму, усиливал эффект низкой дозы ципрофлоксацина (0.03 мкг/мл) и повышал толерантность к канамицину, стрептомицину и высоким дозам ципрофлоксацина. Экстракты, представляющие собой сложные многокомпонентные смеси, производили различный модифицирующий эффект в зависимости от вида антибиотика. Вино, экстракты виноградной кожицы, серпухи и пажитника защищали клетки *E. coli* от бактерицидного действия ципрофлоксацина и цефотаксима. При этом все перечисленные субстанции, за исключением вина, и серпистен могли усиливать антибактериальное действие аминогликозидов канамицина и стрептомицина. Следует отметить различие в эффектах высоких и низких доз кварцетина и ресвератрола. В отличие от высоких концентраций, которые проявляли протекторные свойства, низкие дозы этих полифенолов усиливали эффект канамицина и ципрофлоксацина.

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

Модулирующее влияние экстрактов серпухи и пажитника на бактерии при окислительном стрессе и действии антибиотиков обусловлено в большей степени входящими в их состав полифенолами, чем экидистероидами. В свою очередь, противоположные эффекты, наблюдаемые при воздействии 20-гидроксиэкдизона и серпистена на чувствительность бактерий к стрептомицину и канамицину, могут быть обусловлены содержанием 25S-инокостерона и других минорных экидистероидов, входящих в состав серпистена. Индукция SOS-регулона изученными препаратами, содержащими экидистероиды, может вносить непосредственный вклад в модуляцию восприимчивости *E. coli* к ципрофлоксацину.

Таблица 2. Влияние препаратов на МИК, удельную скорость роста и колониеобразующую способность *E. coli* при действии антибиотиков.

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

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

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

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

## ВЫВОДЫ

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

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

*Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ*

1. Безматерных, К.В. Влияние экстрактов серпухи венценосной и пажитника сеного на устойчивость бактерий *Escherichia coli* к пероксидному стрессу / К.В. Безматерных, С.О. Володина, В.В. Володин, З.Ю. Самойлова, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Известия Самарского НЦ РАН. – 2013. – Т. 15. – № 3(5). – С. 1567-1570.
2. Безматерных К.В. Оценка антиоксидантной активности экстрактов *Allium schoenoprasum* и

*Rubus chamaemorus*, произрастающих в Республике Коми / К.В. Безматерных, Т.И. Ширшова, И.В. Бешлей, Н.В. Матистов, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский, В.В. Володин // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48. – № 2. – С. 36-40. (SCOPUS, Web of Science).

3. Smirnova, G. The effect of 20-hydroxyecdysone on the susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics / G. Smirnova, K. Bezmaternykh, O. Oktyabrsky // J. Appl. Microbiol. – 2016. – V. 121(6). – P. 1511-1518. (SCOPUS, Web of Science).

4. Безматерных, К.В. Модифицирующее действие экстрактов кожицы винограда и красного вина на чувствительность бактерий *Escherichia coli* к различным антибиотикам / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». – 2016. – Вып. 4. – С. 322-329.

5. Самойлова, З.Ю. Оценка пребиотической активности экстрактов растений для разработки препаратов, стимулирующих кишечную микрофлору / З.Ю. Самойлова, К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». – 2016. – Вып. 4. – С. 362-367.

6. Безматерных, К.В. Влияние кверцетина на чувствительность *Escherichia coli* к стрептомицину / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20(S1). – С. 12-13.

#### Публикации в других журналах и сборниках

7. Безматерных, К.В. Изучение антиоксидантных и адаптогенных свойств растений, продуцентов экидистероидов, с использованием микробных тест-систем / К.В. Безматерных, С.О. Володина, В.В. Володин, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Сборник статей V междунар. науч.-практ. конф. «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». – Санкт-Петербург. – 2013. – Т. 2. – С. 104-105.

8. Безматерных, К.В. Влияние экстрактов серпухи венценосной и пажитника сенного на устойчивость бактерий *Escherichia coli* к пероксидному стрессу / К.В. Безматерных, С.О. Володина, В.В. Володин, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Тез. докл. IX молодежной шк.-конф. с междунар. участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва. – 2013. – С. 56-58.

9. Безматерных, К.В. Изучение адаптогенных свойств растений, продуцентов экидистероидов, с использованием микробных тест-систем / К.В. Безматерных, В.В. Володин, С.О. Володина, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Abstracts of the IV International Scientific Conference «The Future Belongs to Us». – Кишинев. – 2014. – 17 с.

10. Безматерных, К.В. Изучение адаптогенных свойств растений, продуцентов экидистероидов, с использованием микробных тест-систем / К.В. Безматерных, С.О. Володина, В.В. Володин, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Тез. докл. 18 междунар. шк.-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2014. – С. 10-11.

11. Безматерных, К.В. Влияние растений, источников экидистероидов, на устойчивость бактерий *Escherichia coli* к пероксидному стрессу / К.В. Безматерных // Материалы VII Всерос. конгр. молодых биологов «Симбиоз-Россия 2014». – Екатеринбург. – 2014. – С. 95-96.

12. Безматерных, К.В. Комплексное исследование антиоксидантной активности растительных экстрактов с использованием химических методов и микробных тест-систем / К.В. Безматерных, С.О. Володина, В.В. Володин, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Материалы Всерос. симпозиума с междунар. участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». – Москва. – 2014 – 33 с.

13. Безматерных, К.В. Исследование антиоксидантной и адаптогенной активности растительных экстрактов, содержащих экидистероиды и полифенолы / К.В. Безматерных, В.В. Володин, С.О. Володина, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Сборник материалов IX междунар. симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва. – 2015. – С. 499-502.

14. Безматерных, К.В. Комплексный анализ антиоксидантных и адаптогенных свойств экидистероидсодержащих субстанций / К.В. Безматерных, В.В. Володин, С.О. Володина, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Тез. докл. 19 междунар. шк.-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2015. – С. 161-162.

15. Безматерных, К.В. Влияние полифенол- и экистероидсодержащих экстрактов растений на устойчивость *Escherichia coli* к пероксидному стрессу и антибиотикам / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, С.О. Володина, В.В. Володин, О.Н. Октябрьский // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18). – № 2(1). – С. 632-634.
16. Безматерных, К.В. Влияние полифенол- и экистероидсодержащих экстрактов растений на устойчивость *Escherichia coli* к пероксидному стрессу и антибиотикам / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, С.О. Володина, В.В. Володин, О.Н. Октябрьский // Тез. докл. IX междунар. конф. «Биоантиоксидант». – Москва. – 2015. – 15 с.
17. Безматерных, К. В. Влияние некоторых биологически активных соединений растительного происхождения на устойчивость *Escherichia coli* к пероксидному стрессу / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Тез. докл. 20 междунар. шк.-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2016. – 8 с.
18. Безматерных, К.В. Влияние некоторых биологически активных соединений на экспрессию гена *sulA Escherichia coli* / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Материалы IX Всерос. конгр. молодых биологов «Симбиоз-Россия 2016». – Пермь. – 2016. – С. 8-10.
19. Безматерных, К.В. Модифицирующее действие экстракта кожицы винограда и красного вина на чувствительность *Escherichia coli* к различным антибиотикам / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Тез. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Наукоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения». – Пермь. – 2016. – С. 17-18.
20. Безматерных, К.В. Воздействие ресвератрола на бактерии *Escherichia coli* при пероксидном стрессе / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Материалы VIII Всерос. конф. молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». – Саратов. – 2016. – 43 с.
21. Безматерных, К.В. Модифицирующее воздействие ресвератрола на чувствительность бактерий *Escherichia coli* к канамицину и стрептомицину / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Тез. IV междунар. конф. «Микробное разнообразие: ресурсный потенциал». – Пермь. – 2016. – 14 с.
22. Безматерных, К.В. Модифицирующее действие ресвератрола на восприимчивость *Escherichia coli* к ципрофлоксацину / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Тез. докл. 21 междунар. шк.-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2017. – 7 с.
23. Безматерных К.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. Влияние биологически активных соединений на индукцию стрессовых регулонов и толерантность к антибиотикам у бактерий *Escherichia coli* / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований: сб. науч. тр. по материалам науч. конф., посвящ. 100-летию кафедры физиологии растений и микроорганизмов Перм. гос. нац. исслед. ун-та. – Пермь. – 2017. – С. 58-61.
24. Безматерных, К.В. Изучение влияния ресвератрола на чувствительность *Escherichia coli* к стрептомицину / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Тез. докл. 22 междунар. шк.-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2018. – 276 с.
25. Безматерных, К.В. Влияние ресвератрола на физиологические параметры и чувствительность к ципрофлоксацину бактерий *Escherichia coli* / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Сборник материалов X междунар. симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва. – 2018. – 419-423.
26. Безматерных, К.В. Влияние кверцетина на физиологические параметры и чувствительность к ципрофлоксацину бактерий *Escherichia coli* / К.В. Безматерных, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Материалы II междунар. науч. конф. «Высокие технологии, определяющие качество жизни». – Пермь. – 2018. – С. 43-46.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность за предоставленные экистероидсодержащие препараты д.б.н., профессору, заведующему лабораторией В.В. Володину и всем сотрудникам лаборатории биохимии и биотехнологии растений Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

БЕЗМАТЕРНЫХ КСЕНИЯ ВИКТОРОВНА

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

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Подписано в печать \_\_.\_\_.2018.

Формат 60×90/16.

Усл.печ.л. 1. Тираж 120 экз. Заказ №

Набор компьютерный

---

Отпечатано в «Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения  
Российской академии наук» – филиале Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13