

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.22

К. В. Безматерных<sup>a</sup>, Г. В. Смирнова<sup>a</sup>, О. Н. Октябрьский<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>b</sup> Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ КОЖИЦЫ ВИНОГРАДА И КРАСНОГО ВИНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* К РАЗЛИЧНЫМ АНТИБИОТИКАМ

Экстракты красного вина и кожицы винограда содержат значительное количество полифенолов, включая активные антиоксиданты кверцетин и ресвератрол, и проявляют высокую антирадикальную и хелатирующую способность. Внесение экстрактов в культуру *E. coli* вызывает 30%-ное ингибирование скорости роста, индукцию антиоксидантных генов *katG* и *sodA* и повышение устойчивости бактерий к перекиси водорода. Предобработка клеток *E. coli* каждым из экстрактов снижает бактерицидную активность ципрофлоксацина и цефотаксима и, наоборот, усиливает чувствительность бактерий к канамицину и стрептомицину. Воздействие экстрактов осуществляется, по-видимому, путем их влияния на скорость роста бактерий, редокс-статус клеток и уровень экспрессии антиоксидантных генов. В случае ципрофлоксацина, предобработка экстрактами может снижать степень повреждения ДНК и уровень индукции SOS-ответа. Модулирующий эффект экстрактов должен учитываться при антибиотикотерапии.

**Ключевые слова:** растительные экстракты; полифенолы; антиоксидантные гены; антибиотики; *E. coli*.

K. V. Bezmaternykh<sup>a</sup>, G. V. Smirnova<sup>a</sup>, O. N. Oktyabrsky<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

MODIFYING EFFECT OF GRAPE SKIN AND RED WINE EXTRACTS ON *ESCHERICHIA COLI* SUSCEPTIBILITY TO VARIOUS ANTIBIOTICS

Extracts from red wine and grape skin contain a significant amount of polyphenols, including quercetin and resveratrol, and possess high antiradical and chelating ability. Addition of these extracts into *E. coli* culture causes a 30% inhibition of the growth rate, an induction of antioxidant genes *katG* and *sodA* and a rise in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance. Pretreatment of *E. coli* with the extracts attenuates bactericidal activity of ciprofloxacin and cefotaxim and, in contrast, augments *E. coli* susceptibility to kanamycin and streptomycin. The extracts may exert their action by influence on the growth rate, redox state of cells and expression of antioxidant genes. In the case of ciprofloxacin, pretreatment with the extracts can decrease DNA damage and the level of the SOS response. The modulating effect of extracts should be taken into consideration in antibiotic therapy.

**Key words:** plant extracts; polyphenols; antioxidant genes; antibiotics; *E. coli*.

**Введение**

Полифенолы, являющиеся обычными компонентами продуктов растительного происхождения и входящие в состав медицинских и косметических препаратов, привлекают растущий интерес в связи с их положительным влиянием на здоровье чело-

века [Crozier, Jaganath, Clifford, 2009]. Эти соединения обладают антиоксидантными свойствами благодаря способности связывать свободные радикалы и хелатировать ионы железа [Rice-Evans et al., 1995; Perron, Brumaghim, 2009]. Вместе с тем, в аэробных условиях полифенолы могут подвергаться аутоокислению и генерировать активные

формы кислорода, выступая в качестве прооксидантов [Tang, Halliwell, 2010]. При действии на живые клетки полифенолы модулируют передачу внутриклеточных сигналов и влияют на регуляцию экспрессии генов и активности ферментов, участвующих в ответе на окислительный и другие стрессы [Eberhardt, Jeffery, 2006; Smirnova et al., 2009].

Высокая антиоксидантная и антипролиферативная активность ряда полифенолов (кверцетин, ресвератрол и др.) обуславливает их широкое использование в составе биологически активных добавок и лекарственных препаратов при профилактике и лечении заболеваний, связанных с окислительным стрессом (рак, диабет, сердечно-сосудистые и другие). Кроме того, полифенолы являются компонентами экстрактов лекарственных растений, широко применяемых в традиционной медицине. В последние годы показано, что действие антибиотиков на бактериальные клетки приводит к накоплению окислительных повреждений во всех типах макромолекул (ДНК, белки, липиды), что вносит вклад в бактерицидный эффект [Belenky et al., 2015]. В связи с этим можно ожидать, что при одновременном применении, воздействие на бактерии полифенолов, обладающих антиоксидантными свойствами, может интерферировать с действием антибиотиков, влияя тем самым на эффективность антибиотикотерапии. Ранее мы и другие исследователи показали, что зеленый и черный чай и экстракты некоторых лекарственных растений изменяют чувствительность бактерий *E. coli* к антибиотикам разных классов [Smirnova et al., 2012; Marathe et al., 2013; Samoilova et al., 2014].

Целью настоящей работы является изучение влияния экстрактов вина и кожицы красного винограда, которые являются богатыми источниками полифенолов, включая кверцетин и ресвератрол, на чувствительность бактерий *E. coli* к антибиотикам с разным механизмом действия (ципрофлоксацин, канамицин, стрептомицин и цефотаксим).

## Материалы и методы исследования

**Приготовление экстрактов.** Красное виноградное вино "PRIOS" (Испания) упаривали на ротормном испарителе IKA RV10 (Германия) и лиофильно высушивали. Сухой экстракт разводили в ДМСО. Конечная концентрация экстракта вина в экспериментах с бактериями составляла 3.6 мг/мл. Сухую кожицу красного винограда (10 г) размалывали и экстрагировали 3 раза по 30 мин. раствором этиловый спирт : вода в соотношении 4 : 1 (v/v) на ультразвуковой водяной бане (Elmasonic S10 H, Elma, 37 kHz, 30W) при температуре 60°C. Объединенный экстракт упаривали на ротормном испарителе

и лиофильно высушивали. Конечная концентрация экстракта кожицы в экспериментах с бактериями составляла 3.8 мг/мл.

**Общее содержание полифенолов в экстрактах** измеряли модифицированным методом Folin-Ciocalteu [Wu et al., 2006]. Экстракты (10 мкл) смешивали с 40 мкл реагента Folin-Ciocalteu, встряхивали в течение 15 сек. и инкубировали 3 мин. при комнатной температуре. Затем добавляли 100 мкл 7%-ного карбоната натрия, и смесь доводили деионизированной водой до 3 мл. Через 90 мин. инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение при 760 нм, используя спектрофотометр Shimadzu UV-VIS. Полученные значения сравнивали со стандартной кривой, построенной для растворов галловой кислоты, и выражали как эквиваленты галловой кислоты (мкг GAE/мг сухого экстракта).

**Содержание отдельных полифенолов в экстрактах** определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20AD. Разделение проводили на колонке C18 с использованием растворителей: А – ацетонитрил; В – смесь бидистиллированной воды и уксусной кислоты в соотношении 40 : 1. Скорость потока – 1 мл/мин. Режим подачи растворителей: 0–15 мин., А – 14%, В – 86%; 16–45 мин., А – 35%, В – 65%; 46–48 мин., А – 100%. Анализ пиков осуществляли при длинах волн 220–400 нм.

**Хелатирующую активность экстрактов** определяли модифицированным методом [Kim et al., 2005]. Реакционную смесь, содержащую 50 мкл образца и 10 мкл 1 mM FeSO<sub>4</sub>, активировали добавлением 6.7 мкл 5 mM феррозина в ацетатном буфере. Раствор перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин., после чего определяли поглощение при длине волны 562 нм. Хелатирующую активность рассчитывали, используя уравнение

$$\text{Хелатирующий эффект (\%)} = \left( \frac{\text{Поглощение контроля} - \text{Поглощение образца}}{\text{Поглощение контроля}} \right) \times 100.$$

График зависимости хелатирующего эффекта от концентрации исследуемого образца использовали для расчета EC<sub>50</sub> как концентрации, при которой Fe<sup>2+</sup> ионы связываются на 50%.

**Антирадикальную активность** полифенолов и экстрактов определяли по их способности связывать стабильный DPPH радикал [Shyur et al., 2005]. Определение проводили в реакционной смеси, содержащей 3 мл 0.3 mM DPPH'-этанольного раствора, 1 мл 50 mM Tris-HCl буфера (pH 7.4) и 5-20 мкл экстракта. После 30 мин. инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение при

517 нм. Ингибирующий эффект на уровень DPPH<sup>•</sup> рассчитывали согласно формуле

$$\text{Ингибирующий эффект (\%)} = \left( \frac{\text{Поглощение контроля} - \text{Поглощение образца}}{\text{Поглощение контроля}} \right) \times 100.$$

Строили график зависимости ингибирующего эффекта от концентрации исследуемых соединений и определяли величину IC<sub>50</sub> как концентрацию, при которой связывается 50% свободных радикалов DPPH<sup>•</sup>.

**Штаммы бактерий и условия культивирования.** В качестве объекта исследований использовали штамм *E. coli* BW25113  $\Delta(\text{araD-araB})567$ ,  $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$ ,  $\lambda$ -, *rph-1*,  $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$ , *hsdR514*, полученный из *E. coli* Genetic Stock Center (CGSC). Штаммы NM3001 и NM3011, несущие слияния промоторов *sodA* и *sulA(sfiA)* генов со структурным геном *lacZ*, кодирующим  $\beta$ -галактозидазу, были сконструированы путем трансдукции фагом PI слияний *sodA::lacZ* и *sulA(sfiA)::lacZ* из *E. coli* DM4000 (дар проф. M. Volkert) и QC772 (дар проф. D. Touati) в BW25113. Штамм NM3021, несущий транскрипционное геновое слияние *katG::lacZ*, был получен путем трансформации клеток *E. coli* BW25113 плазмидой pKT1033 [Tao et al., 1989]. Штаммы NM3031 и NM3041 со слияниями *katE::lacZ* и *rpoS(katF)::lacZ* были созданы путем трансформации клеток *E. coli* BW25113 плазмидами pRS KatE16 (дар проф. M. Volkert) и pRS 415 KatF5 (дар проф. A. Eisenstark).

Бактерии выращивали на минимальной среде M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O – 15.13 г/л; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3 г/л; NH<sub>4</sub>Cl – 1 г/л; NaCl – 0.5 г/л; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.246 г/л; CaCl<sub>2</sub> – 0.011 г/л) с добавлением 0.15% глюкозы, 0.2% казаминовых кислот и тиамин (10 мкг/мл). За ростом следили путем измерения оптической плотности при длине волны 600 нм (OD<sub>600</sub>).

**Удельную скорость роста** культуры ( $\mu$ ) рассчитывали по формуле

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

где OD<sub>600</sub>(t<sub>2</sub>) и OD<sub>600</sub>(t<sub>1</sub>) – оптическая плотность культуры, измеренная при длине волны 600 нм, во время t<sub>2</sub> и t<sub>1</sub>, t – время в часах.

**Чувствительность *E. coli* к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и антибиотикам** определяли микропланшетным методом. Клетки из ночной культуры центрифугировали и переносили в колбы объемом 250 мл, содержащие 100 мл среды M9, до начальной OD<sub>600</sub> = 0.1 и выращивали на качалках при скорости вращения 140 об/мин и температуре 37°C до OD<sub>600</sub> = 0.6. Далее культуру 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 качалках (140 об/мин, температура 37°C) 20 мин., измеряли OD<sub>600</sub> и в опытные ячейки вносили H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 мМ) или антибиотика ципрофлоксацин (0.03, 0.3 и 3 мкг/мл), стрептомицин (10 и 40 мкг/мл), канамицин (10 и 40 мкг/мл) и цефотаксим (5 и 10 мкг/мл). Отбор проб и измерение OD<sub>600</sub> на микропланшетном спектрофотометре BioRad xMark, проводили до и через 30 и 70 мин. после внесения антибиотиков. Индекс антиоксидантной активности (АОА) рассчитывали как отношение удельной скорости роста бактерий, предобработанных экстрактами, к удельной скорости роста без предобработки через 30 мин. после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Колониеобразующую способность** определяли в образцах из контрольной культуры и культур, обработанных экстрактами и антибиотиками. Пробы отмывали, разводили 0.9%-ным NaCl, капли полученной суспензии (10 мкл) помещали на чашки с LB-агаром и инкубировали в термостате при 37°C. Количество образовавшихся колоний (КОЕ) подсчитывали через 24 ч. инкубации.

**Активность  $\beta$ -галактозидазы** определяли по методу Миллера [Miller, 1972], модифицированному для планшетов [Smirnova et al., 2012] в штаммах *E. coli*, несущих геновое слияние *katG::lacZ*, *sodA::lacZ*, *katE::lacZ*, *rpoS::lacZ* и *sulA(sfiA)::lacZ*.

**Статистическую обработку экспериментальных данных** осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Каждый результат показан как среднее значение по меньшей мере трех-пяти независимых экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверность различий была определена с помощью t-критерия Стьюдента, статистически значимыми считались различия данных при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## Результаты и их обсуждение

Для понимания биологических эффектов экстрактов красного вина и кожицы винограда был предварительно изучен их состав, а также хелатирующая и антиоксидантная активность. Состав и свойства исследуемых экстрактов представлены в табл. 1. Общий уровень полифенолов в экстракте вина был в 2 раза выше, чем в экстракте кожицы винограда. Оба экстракта содержали примерно одинаковое количество ресвератрола, но существенно отличались по уровню кверцетина, которого в экстракте кожицы было в 2 раза больше, чем в экстракте красного вина.

Кверцетин обладает высокой хелатирующей

способностью ( $EC_{50} = 0.004$  мкг), и его повышенное содержание в экстракте кожицы может быть причиной в 2 раза более высокой хелатирующей активности этого экстракта. Напротив, значение  $IC_{50}$  было ниже, то есть антирадикальная активность выше у экстракта вина, чем у экстракта кожицы. Отсутствие параллелизма между хелатирующей и антирадикальной активностями может

объясняться тем, что отдельные компоненты экстрактов, например ресвератрол, проявляют выраженную антирадикальную активность, но при этом не хелатируют железо. В целом способность экстрактов связывать радикалы DPPH<sup>\*</sup> была в 20–30 раз ниже по сравнению с чистым препаратом кверцетина и в 6–9 раз ниже по сравнению с ресвератролом (не показано).

Таблица 1

**Содержание полифенолов, хелатирующая способность и антирадикальная активность экстрактов красного вина и кожицы винограда**

Состав и свойства	Экстракт вина	Экстракт кожицы винограда
Общие полифенолы, мг GAE/г экстракта	111 ± 2	54 ± 1
Ресвератрол, мкг/г экстракта	81.5	75.9
Кверцетин, мкг/г экстракта	55.1	115.6
$EC_{50}$ , мг экстракта	0.169	0.082
$IC_{50}$ , мг экстракта	0.386	0.536

Внесение в культуральную среду экстрактов вина и кожицы винограда приводило к снижению удельной скорости роста *E. coli* на 28 и 30% по сравнению с контролем. Соответственно, в присутствии экстрактов замедлялся прирост числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Таким образом, оба экстракта демонстрировали умеренное бактериостатическое действие на клетки *E. coli*. Бактериостатический эффект был, по-видимому, обусловлен суммарным действием ингредиентов, входящих в состав экстрактов. Кверцетин и ресвератрол в концентрациях, присутствующих в культуральной среде с добавлением экстрактов вина (1.10 мкг/мл и 1.63 мкг/мл) и кожицы винограда (2.31 мкг/мл и 1.52 мкг/мл), не оказывали статистически значимого влияния на  $\mu$  и КОЕ.

Антибактериальная активность растительных экстрактов и отдельных полифенолов была отмечена ранее [Scalbert, 1991; Smith, Imlay, Mackie, 2003; Cushnie, Lamb, 2005; Obeidat et al., 2012; Subramanian et al., 2014]. В ряде случаев было установлено, что механизм бактериостатического и бактерицидного действия полифенолов связан с продукцией активных форм кислорода (АФК) или окислительным повреждением мембран [Smith, Imlay, Mackie, 2003; Subramanian et al., 2014]. АФК могут образовываться в результате аутоокисления полифенолов в аэробных условиях. В частности, ранее мы продемонстрировали, что богатые полифенолами растительные экстракты, а также танин и кверцетин, продуцируют перекись водорода и индуцируют антиоксидантные гены *katG* и *sodA*, кодирующие, соответственно, каталазу НРІ и Mn-супероксиддисмутазу [Smirnova et al., 2009; Samoilova et al., 2014]. Индукция антиоксидантных генов и возрастание активности ферментов, осуществляющих деструкцию АФК, способствуют повышению устойчивости к последующему окислительному стрессу [Smirnova et al., 2009; Samoilova

et al., 2014].

Измерение активности  $\beta$ -галактозидазы в штаммах, несущих слияние с геном *lacZ*, показало, что экстракты вина и кожицы винограда индуцируют экспрессию генов *katG* и *sodA* (табл. 2). Как отмечалось ранее, индукция этих генов может быть связана с генерацией активных форм кислорода при аутоокислении полифенолов и с активацией Fug регулона, в состав которого входит ген *sodA*, вследствие дефицита железа в результате его хелатирования [Smirnova et al., 2009]. Экспрессия гена *rpoS*, кодирующего транскрипционный регулятор общего стрессового ответа, не изменялась в присутствии экстракта вина и достоверно снижалась экстрактом кожицы винограда (табл. 2). Аналогичным образом изменялась экспрессия подконтрольного регулятору RpoS гена *katE*, кодирующего каталазу НРІІ. Экспрессия гена *sulA*, входящего в состав SOS-регулона, который активируется в ответ на повреждение ДНК, не зависела от наличия экстрактов в среде.

Ранее было показано, что ресвератрол вызывает фрагментацию ДНК и дозозависимое повышение экспрессии гена *sulA* [Hwang, Lim, 2015]. В наших экспериментах концентрация ресвератрола в составе вина и кожицы винограда, а также соответствующая доза чистого препарата были недостаточны для того, чтобы вызвать SOS-ответ.

Повышение экспрессии антиоксидантных генов *katG* и *sodA* способствовало возрастанию устойчивости бактерий к последующему пероксидному стрессу. Индекс антиоксидантной активности (отношение удельной скорости роста бактерий, предобработанных экстрактом, к необработанным клеткам через 30 мин. после добавления  $H_2O_2$ ) составлял 5.3 и 5.5 для экстрактов вина и кожицы винограда, соответственно (табл. 2). Таким образом, исследуемые экстракты демонстрировали высокую антиоксидантную активность как в химиче-

ском, так и в биологическом тесте.

Ранее мы и другие исследователи показали, что экстракты некоторых лекарственных растений способны модифицировать действие на *E. coli* антибиотиков, имеющих различные внутриклеточные мишени (синтез ДНК, клеточной стенки и белка). Направление и сила эффекта в значительной мере зависели от природы антибиотика и вида экстракта и были связаны с экспрессией антиокси-

дантных генов и хелатированием железа [Smirnova et al., 2012; Marathe et al., 2013; Samoilova et al., 2014]. В данной работе исследовалось влияние экстрактов вина и кожицы винограда на чувствительность *E. coli* к антибиотикам ципрофлоксацину (синтез ДНК), цефотаксиму (синтез клеточной стенки) и аминогликозидам канамицину и стрептомицину (синтез белка).

Таблица 2

**Влияние экстрактов красного вина и кожицы винограда на экспрессию исследуемых генов и индекс АОА**

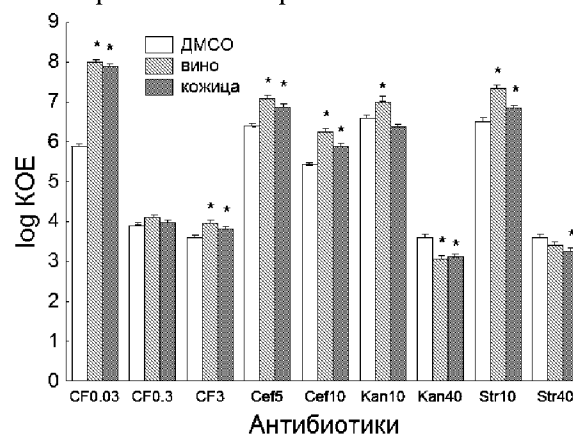
Активность $\beta$ -галактозидазы, ед. Миллера	Контроль (ДМСО)	Экстракт вина	Экстракт кожицы винограда
<i>katG::lacZ</i>	70±3	121±8* (1.73)	139±11* (1.99)
<i>katE::lacZ</i>	417±31	409±28 (0.98)	358±21 (0.86)
<i>rpoS::lacZ</i>	262±16	226±14 (0.86)	202±9* (0.77)
<i>sodA::lacZ</i>	55±2	94±5* (1.71)	100±8* (1.82)
<i>sulA::lacZ</i>	56±5	47±2 (0.84)	56±2 (1.0)
Индекс АОА	1.0	5.3	5.5

Представлены данные через 50 мин. экспозиции с экстрактами. В скобках указан коэффициент относительно контроля. \*Статистически достоверная разница с контролем ( $p < 0.05$ ).

Низкие дозы ципрофлоксацина (0.03 и 0.3 мкг/мл) не ингибировали рост в течение 30 мин. после воздействия. В этих условиях предобработка бактерий экстрактами вина и кожицы винограда снижала удельную скорость роста на 30–40%. Высокая доза ципрофлоксацина (3 мкг/мл), напротив, быстро ингибировала рост. При этом в культурах, предобработанных экстрактами,  $\mu$  было на 30% выше, чем в тех, которые были обработаны только антибиотиком. В случае канамицина и стрептомицина экстракты вина и кожицы винограда усиливали ингибирование роста, вызванное антибиотиками (10 и 40 мкг/мл). Наиболее выраженный эффект предобработки экстрактами на рост бактерий наблюдался при экспозиции к цефотаксиму. Цефотаксим вызывал лизис клеток через 23 и 18 мин. после внесения в среду при дозе 5 и 10 мкг/мл, соответственно. Предобработка экстрактами предотвращала лизис в течение 70 мин. при концентрации цефотаксима 5 мкг/мл и существенно замедляла его при более высокой дозе антибиотика. Эти результаты хорошо согласуются с полученными нами ранее данными о влиянии богатых полифенолами экстрактов (зеленый и черный чай, толокнянка, брусника и др.) на рост *E. coli* в присутствии антибиотиков с разным механизмом действия [Samoilova et al., 2014].

При экспозиции *E. coli* ко всем изученным антибиотикам наблюдалось дозозависимое снижение числа КОЕ (рисунок). Предобработка бактерий экстрактами вина и кожицы винограда повышала значение КОЕ при действии низкой дозы ципрофлоксацина (0.03 мкг/мл) в 138 и 88 раз, соответственно. Концентрации кверцетина и ресвератрола,

близкие к тем, которые содержатся в экстрактах, оказывали противоположное действие, повышая чувствительность бактерий к низкой дозе ципрофлоксацина. При более высоких концентрациях ципрофлоксацина протекторный эффект предобработки экстрактами был выражен значительно слабее.



**Влияние экстрактов вина и кожицы винограда на выживаемость *E. coli* BW25113 при экспозиции к антибиотикам с разным механизмом действия.**

CF0.03, CF0.3, CF3 – 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл ципрофлоксацина; Cef5, Cef10 – 5 и 10 мкг/мл цефотаксима; Kan10, Kan40 – 10 и 40 мкг/мл канамицина; Str10, Str40 – 10 и 40 мкг/мл стрептомицина. Представлены данные через 70 мин. после добавления антибиотика. \*Статистически достоверная разница по сравнению с действием антибиотика на клетки, не обработанные экстрактами ( $p < 0.05$ )

Предобработка экстрактами в 3–6 раз повышала КОЕ при действии обеих доз цефотаксима, что хорошо согласуется со способностью экстрактов ингибировать лизис, индуцированный этим анти-

биотиком. Напротив, экстракты вина и кожицы винограда в 2–4 раза усиливали бактерицидную активность высоких доз канамицина и стрептомицина (рисунок).

Аналогичным образом на чувствительность к канамицину и стрептомицину влияли кверцетин и ресвератрол. Данные, полученные в настоящей работе, хорошо согласуются с результатами наших предшествующих исследований, показавших, что экстракты зеленого и черного чая, толокнянки и брусники ослабляют бактерицидный эффект ципрофлоксацина и ампициллина, но повышают восприимчивость к канамицину. Эффекты, вызываемые экстрактами, были тесно связаны с суммарным уровнем полифенолов и могли быть обусловлены влиянием на степень окислительного стресса в присутствии антибиотиков. Сходство модифицирующего действия различных экстрактов на чувствительность к антибиотикам может свидетельствовать об общности факторов и механизмов, ведущих к такой модификации.

Недавно мы показали [Смирнова и др., 2016], что скорость роста бактерий может быть основным фактором, определяющим их чувствительность к ципрофлоксацину и ампициллину, независимо от условий, влияющих на рост. Экстракты вина и кожицы винограда вызывали 30%-ное ингибирование скорости роста, которое могло быть следствием прооксидантной и хелатирующей активности полифенолов, входящих в их состав. Такое снижение скорости роста может быть причиной протекторного действия экстрактов при экспозиции бактерий к ципрофлоксацину и цефотаксиму, который, как и ампициллин, относится к классу  $\beta$ -лактамов. Кроме того, показано, что действие антибиотиков на уровне первичных мишеней влечет за собой неспецифические метаболические изменения, способствующие окислительному повреждению всех типов макромолекул в клетке (ДНК, белки, липиды) [Belenky et al., 2015]. Предобработка экстрактами изменяет редокс-ситуацию внутри клеток и стимулирует экспрессию антиоксидантных генов *katG* и *sodA*, что также может вносить вклад в модуляцию восприимчивости к антибиотикам. Поскольку исследуемые антибиотики имеют различные первичные внутриклеточные мишени, модулирующий эффект, производимый экстрактами, может сильно варьировать в зависимости от типа антибиотика, вплоть до противоположного воздействия у аминогликозидов по сравнению с хинолонами и  $\beta$ -лактамами.

Внутриклеточной мишенью фторхинолона ципрофлоксацина являются бактериальные топоизомеразы. Хинолоны связываются с комплексом ДНК-фермент, препятствуя восстановлению разрывов в молекуле ДНК, что приводит к фрагментации хромосом и, в конечном итоге, к гибели кле-

ток [Drlica et al., 2008]. Экспозиция к ципрофлоксацину, как и к другим агентам, повреждающим ДНК, индуцирует SOS-ответ, контролирующей репарацию ДНК и филаментацию клеток [Pidcock, Wise, 1987]. В наших экспериментах ципрофлоксацин индуцировал экспрессию принадлежащего к SOS-регулону гена *sulA*. Максимальный уровень экспрессии наблюдался при концентрации ципрофлоксацина 0.3 мкг/мл. Предобработка экстрактами вина и кожицы винограда значительно ингибировала экспрессию *sulA* при этой концентрации ципрофлоксацина, свидетельствуя о снижении степени повреждения ДНК. Необходимы дальнейшие исследования для точного определения сайтов, на которые влияют компоненты экстрактов при действии других антибиотиков.

### Заключение

Полученные в работе данные показывают, что предобработка клеток *E. coli* экстрактами вина и кожицы винограда снижает чувствительность бактерий к ципрофлоксацину и цефотаксиму, но повышает восприимчивость к высоким дозам канамицина и стрептомицина. Модифицирующий эффект может быть связан с суммарным действием полифенолов в составе экстрактов. 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 продуктов, богатых полифенолами, на бактерицидную активность различных антибиотиков должно учитываться при антибактериальной терапии.

Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов РФФИ №14-04-96031, 16-04-00762 и Программы УрО РАН №15-4-4-16.

### Библиографический список

- Смирнова Г.В. и др. Роль тиоловых редокс-систем при ответе бактерий *Escherichia coli* на стрессорные воздействия температур и антибиотиков // Микробиология. 2016. Т. 85(1). С. 1–11.
- Belenky P. et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage // Cell Rep. 2015. Vol. 13. P. 968–980.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health // Nat. Prod. Rep. 2009. Vol. 26. P. 1001–1043.
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids // Int. J. Antimicrob. Agents 2005. Vol. 26. P. 343–356.
- Drlica K. et al. Quinolone-mediated bacterial death //

- Antimicrob. Agents Chemother. 2008. Vol. 52. P. 385–392.
- Eberhardt M.V., Jeffery E.H. Perspective. When dietary antioxidants perturb the thiol redox // *J. Sci. Food Agric.* 2006. Vol. 86. P. 1996–1998.
- Hwang D., Lim Y.H. Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 10029.
- Kim H-J. et al. Evaluation of antioxidant activity of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents // *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53. P. 7691–7695.
- Marathe S.A. et al. Curcumin reduces the antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. Vol. 68. P. 139–152.
- Miller J.H. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1972.
- Obeidat M. et al. Antimicrobial activity of crude extracts of some plant leaves // *Res. J. Microbiol.* 2012. Vol. 7. P. 59–67.
- Perron N.R., Brumaghim J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding // *Cell Biochem. Biophys.* 2009. Vol. 53. P. 75–100.
- Piddock L.J.V., Wise R. Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents // *FEMS Microbiol. Lett.* 1987. Vol. 41. P. 289–294.
- Rice-Evans C.A. et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids // *Free Radic. Res.* 1995. Vol. 22. P. 375–383.
- Samoilova Z. et al. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics // *Microb. Res.* 2014. Vol. 169. P. 307–317.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins // *Phytochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 3875–3883.
- Shyur L-F. et al. Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan // *Inter. J. Appl. Sci. Eng. Technol.* 2005. Vol. 3. P. 195–202.
- Smirnova G.V. et al Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress. // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. Vol. 46. P. 759–768.
- Smirnova G. et al. Influence of plant polyphenols and medicinal plant extracts on antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* // *J. Appl. Microbiol.* 2012. Vol. 113. P. 192–199.
- Smith A.H., Imlay J.A., Mackie R.I. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 3406–3411.
- Subramanian M. et al. Resveratrol induced inhibition of *Escherichia coli* proceeds via membrane oxidation and independent of diffusible reactive oxygen species generation // *Redox biology.* 2014. Vol. 2. P. 865–872.
- Tang S.Y., Halliwell B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 394. P. 1–5.
- Tao K. et al. Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins // *Mol. Gen. Genet.* 1989. Vol. 218. P. 371–376.
- Wu L-C. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya // *Food Chem.* 2006. Vol. 95. P. 319–327.

### References

- Smirnova G.V., Lepekhina E.V., Muzyka N.G. et al. [Role of thiol redox systems in *Escherichia coli* response to thermal and antibiotic stresses] *Mikrobiologiya.* V. 85 (2016): pp. 1–11. (In Russ).
- Belenky P., Ye J.D., Porter C.B.M. et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell Rep.* V. 13 (2015): pp. 968–980.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* V. 26 (2009): pp. 1001–1043.
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* V. 26 (2005): pp. 343–356.
- Drlica K., Malik M., Kerns R.J. et al. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob. Agents Chemother.* V. 52 (2008): pp. 385–392.
- Eberhardt M.V., Jeffery E.H. Perspective. When dietary antioxidants perturb the thiol redox. *J. Sci. Food Agric.* V. 86 (2006): pp. 1996–1998.
- Hwang D., Lim Y.H. Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression. *Sci. Rep.* V. 5 (2015): pp. 10029.
- Kim H-J., Chen F., Wang X. et al. Evaluation of antioxidant activity of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents. *J. Agric. Food Chem.* V. 53. (2005): pp. 7691–7695.
- Marathe S.A., Kumar R., Ajitkumar P. et al. Curcumin reduces the antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *J. Antimicrob. Chemother.* V. 68 (2013): pp. 139–152.
- Miller J.H. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1972.
- Obeidat M., Shatnawi M., Al dmoor H. et al. Antimicrobial activity of crude extracts of some plant leaves. *Res. J. Microbiol.* V. 7 (2012): pp. 59–67.
- Perron N.R., Brumaghim J.L. A review of the anti-

- oxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* V. 53 (2009): pp. 75–100.
- Piddock L.J.V., Wise R. Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiol. Lett.* V. 41 (1987): pp. 289–294.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G. et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* V. 22 (1995): pp. 375–383.
- Samoilova Z., Smirnova G., Muzyka N. et al. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics. *Microb. Res.* V. 169 (2014): pp. 307–317.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* V. 30 (1991): pp. 3875–3883.
- Shyur L-F., Tsung J-H., Chen J-H. et al. Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan. *Inter. J. Appl. Sci. Eng. Technol.* V. 3 (2005): pp. 195–202.
- Smirnova G.V., Samoylova Z.Y., Muzyka N.G. et al. Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* V. 46 (2009): pp. 759–768.
- Smirnova G., Samoilova Z., Muzyka N. et al. Influence of plant polyphenols and medicinal plant extracts on antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* V. 113 (2012): pp. 192–199.
- Smith A.H., Imlay J.A., Mackie R.I. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 69 (2003): pp. 3406–3411.
- Subramanian M., Goswami M., Chakraborty S. Resveratrol induced inhibition of *Escherichia coli* proceeds via membrane oxidation and independent of diffusible reactive oxygen species generation. *Redox biology.* V. 2 (2014): pp. 865–872.
- Tang S.Y., Halliwell B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 394 (2010): pp. 1–5.
- Tao K., Makino K., Yonei S. et al. Molecular cloning and nucleotide sequencing of oxyR, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol. Gen. Genet.* V. 218 (1989): pp. 371–376.
- Wu L-C., Hsu H-W., Chen Y-C. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem.* V. 95 (2006): pp. 319–327.

Поступила в редакцию 23.08.2016

#### Об авторах

Безматерных Ксения Викторовна, ст. инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов  
ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»  
614081, Пермь, ул. Голева, 13;  
hydrargyrum@iegm.ru; (342)2122086

Смирнова Галина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов  
ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»  
614081, Пермь, ул. Голева, 13;  
smirnova@iegm.ru; (342)2122086

Октябрьский Олег Николаевич, доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией физиологии и генетики микроорганизмов  
ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»  
614081, Пермь, ул. Голева, 13; oktyabr@iegm.ru  
профессор кафедры химии и биотехнологии  
ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»  
614990, Пермь, Комсомольский пр., 29

#### About the authors

Bezmaternykh Kseniya Viktorovna, engineer of laboratory of physiology and genetics of microorganisms  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; hydrargyrum@iegm.ru; (342)2122086

Smirnova Galina Vasil'evna, doctor of biology, leading researcher of laboratory of physiology and genetics of microorganisms  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; smirnova@iegm.ru; (342)2122086

Oktyabrsky Oleg Nikolaevich, doctor of biology, professor, director of laboratory of physiology and genetics of microorganisms  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; oktyabr@iegm.ru  
professor of the Department of Chemistry and Biotechnology  
Perm National Research Polytechnic University.  
Komsomolsky pr., 29, Perm, Russia, 614990