

УДК 57.083.138.4

## ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ СЕРПУХИ ВЕНЦЕНОСНОЙ И ПАЖИТНИКА СЕННОГО НА УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* К ПЕРОКСИДНОМУ СТРЕССУ

©2013 К.В. Безматерных<sup>1</sup>, С.О. Володина<sup>2</sup>, В.В. Володин<sup>2</sup>, З.Ю. Самойлова<sup>1</sup>,  
Г.В. Смирнова<sup>1</sup>, О.Н. Октябрьский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

<sup>2</sup>Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар

Поступила 01.06.2013

Исследовалось влияние экстрактов серпухи венценосной, пажитника сеного и экидистероидсодержащей субстанции Серпистен на экспрессию стрессовых генов и устойчивость бактерий *E. coli* к действию перекиси водорода. Установлено, что все изученные субстанции вызывают экспрессию антиоксидантных генов *katG* и *sodA*, кодирующих каталазу-гидропероксидазу I и Mn-супероксиддисмутазу, соответственно. Экстракты серпухи и пажитника проявляли протекторный эффект от бактериостатических доз перекиси водорода, в то время как Серпистен не влиял на устойчивость бактерий к пероксидному стрессу. Защитное действие экстрактов, по-видимому, было обусловлено содержанием в них полифенолов, обладающих радикалсвязывающей, хелатирующей и прооксидантной активностью.

**Ключевые слова:** экстракты растений, экидистероиды, полифенолы, антиоксидантные гены, бактерии *Escherichia coli*, пероксидный стресс.

Растения способны синтезировать широкий спектр биологически активных соединений разнообразной химической природы, функции большинства из которых до настоящего времени недостаточно изучены. Большой научный и практический интерес представляют исследования фитозкидистероидов, структурно идентичных или близких гормонам линьки членистоногих. Предполагается, что в растениях фитозкидистероиды выполняют экологическую функцию, участвуя во взаимоотношениях между растениями и растительноядными беспозвоночными и регулируя численность фитофагов. Экидистероиды непосредственно не взаимодействуют с рецепторами стероидных гормонов млекопитающих, однако проявляют высокую биологическую активность, положительно влияя на обменные процессы в организме и повышая устойчивость к различным стрессовым воздействиям [1]. На основе экстрактов растений, богатых экидистероидами, созданы препараты, обладающие адаптогенными свойствами. К ним относится экидистероидсодержащая субстанция Серпистен, разработанная коллективом лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Серпистен получен из надземных частей серпухи венценосной (*Serratula coronata*) и представляет собой смесь 20-гидроксиэкидизона (20E) и инокостерона (In), являющегося структурным изомером 20E, в соотношении 8:1. Продемонстрировано противолу-

чевое, гематопротекторное, стресс-протекторное, нейротропное, противодиабетическое и гипополипидемическое действие Серпистена [2]. В то же время необходимы дополнительные исследования фитозкидистероидов, чтобы подтвердить их безвредность для человека. С этой точки зрения представляется актуальным исследование влияния экидистероидсодержащих субстанций на микробиоту человека, которая в последние годы рассматривается как полноценный орган, выполняющий важные метаболические функции. Целью данной работы являлось изучение влияния экстрактов серпухи венценосной и пажитника сеного, а также субстанции Серпистен на экспрессию стрессовых регулонов и устойчивость к пероксидному стрессу у обычного обитателя кишечника бактерии *E. coli*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Используемые в работе штаммы *E. coli* NM3021 (*katG::lacZ*), NM3041 (*rpoS::lacZ*) и NM3031 (*katE::lacZ*) созданы на основе штамма BW25113 (дикий тип) путем трансформации плазмид pKT1033 (*katG::lacZ*) (получена в дар от К. Тао, Япония), pRS415 *katF5* (*rpoS::lacZ*) и pRSkatE16 (*katE::lacZ*) (дар проф. А.Эйзенштарка, США), несущих слияния промоторов изучаемых генов со структурным геном β-галактозидазы. Штамм NM3001 (*sodA::lacZ*) сконструирован путем трансдукции фагом P1 хромосомного слияния *sodA::lacZ* из штамма QC772 (проф. Д. Тоуати, Франция) в штамм BW25113. Бактерии выращивали на среде M9 с добавлением 2 г/л глюкозы, 0.2% казаминовых кислот и 10 мкг/мл тиамин. За ростом бактерий следили путем измерения оптической плотности культуры при длине волны 600 нм.

Устойчивость бактерий к пероксидному стрессу определяли следующим образом. Ночную культуру выращивали в термостате при 37°C. Клетки из ночной культуры центрифугировали и переносили в

Безматерных Ксения Викторовна, инженер, аспирант, e-mail: hvdgargyrum@iegm.ru; Володин Владимир Витальевич, д.б.н., проф., заведующий лабораторией, e-mail: volodin@ib.komisc.ru; Володина Светлана Олеговна, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: volodina@ib.komisc.ru; Самойлова Зоя Юрьевна, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: samzu@mail.ru; Смирнова Галина Васильевна, д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: smirnova@iegm.ru; Октябрьский Олег Николаевич, д.б.н., проф., заведующий лабораторией, e-mail: oktyabr@iegm.ru.

колбы объемом 250 мл, содержащие 100 мл среды M9, до начальной  $OD_{600}=0.1$  и выращивали на качалках при скорости вращения 140 об/мин и температуре 37°C до  $OD_{600}=0.6$ . Далее культуру центрифугировали и ресуспендировали в 8 мл среды M9. В ячейки иммунологического планшета добавляли по 5 мкл исследуемых экстрактов, 5 мкл концентрированных клеток (до конечной  $OD_{600}=0.1$ ) и среду M9 до общего объема 200 мкл.  $OD_{600}$  измеряли до и после добавления клеток, чтобы учесть цветность экстракта. Планшеты культивировали на качалках (140 об/мин, температура 37°C) 20 мин, измеряли  $OD_{600}$  и в опытные ячейки вносили  $H_2O_2$  до концентрации 0.1 мМ и 4 мМ. Культивирование продолжали в течение 30 мин, после чего измеряли  $OD_{600}$  на микропланшетном спектрофотометре BioRad xMark. Удельную скорость роста ( $\mu$ ) рассчитывали по формуле  $\mu = \ln(N_1/N_0) / t_1 - t_0$ , где  $N_0$  и  $N_1$  – оптическая плотность культуры во время  $t_0$  и  $t_1$ , соответственно.

Уровень экспрессии генов определяли путем измерения активности  $\beta$ -галактозидазы в штаммах, несущих слияния с геном *lacZ*. Активность  $\beta$ -галактозидазы измеряли по методу Миллера [3], модифицированному для иммунологических планшетов [4]. Также определяли радикалсвязывающую активность [5], металл-хелатирующую способность экстрактов [6] и содержание полифенолов в испытуемых экстрактах [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов по влиянию исследуемых субстанций на экспрессию стрессовых генов и устойчивость бактерий к пероксидному стрессу представлены в таблице 1.

Все экстракты и Серпистен при концентрации в среде культивирования 0.4 мг и 0.1 мг сухого вещества на 1 мл среды, соответственно, не оказывали существенного влияния на скорость роста бактерий. Исключение составлял экстракт пажитника сенного, который в трех штаммах из четырех изученных ингибировал рост на 20%. Присутствие экстрактов серпухи и пажитника в среде культивирования приводило к 1.5-2-кратному повышению уровня экспрессии генов *katG* и *sodA*, кодирующих каталазу-гидропероксидазу I и Mn-супероксиддисмутазу, соответственно. Серпистен также повышал экспрессию генов *katG* в 1.6 раза и *sodA* в 1.3 раза. Экстракты серпухи и Серпистен не оказывали существенного влияния на экспрессию генов *rpoS* и *katE*. Экстракт пажитника индуцировал экспрессию гена *rpoS* в 1.24 раза и гена *katE* – в 1.37 раза. Ген *rpoS* кодирует  $\sigma^S$  субъединицу РНК-полимеразы (RpoS), которая контролирует экспрессию большого числа генов общего стрессового ответа, индуцируется при замедлении роста и обеспечивает устойчивость ко многим стрессам. Ген *katE* находится под контролем RpoS и кодирует гидропероксидазу II. Индукция *rpoS* и *katE* в присутст-

вии экстракта пажитника может быть связана с его ингибирующим влиянием на рост бактерий, которое наблюдалось в наших экспериментах.

Внесение перекиси водорода в среду культивирования сопровождается полной остановкой роста бактерий, возобновление роста происходит при снижении концентрации пероксида в среде под действием внутриклеточных каталаз. Величина удельной скорости роста бактерий через 30 мин экспозиции к  $H_2O_2$  может служить мерой устойчивости бактерий к пероксидному стрессу [8, 9]. Предобработка бактериальных культур всех изученных штаммов экстрактами серпухи и пажитника до добавления 4 мМ  $H_2O_2$  приводила к 2-3-кратному возрастанию скорости роста по сравнению с культурой, предобработанной диметилсульфоксидом, который использовался в качестве растворителя для экстрактов. Таким образом, экстракты проявляли адаптогенное действие, повышая устойчивость бактерий к перекиси водорода. Серпистен в изученной концентрации не оказывал защитного влияния на рост бактерий.

Ген *katG* индуцируется в ответ на повышение концентрации эндогенной и экзогенной перекиси водорода. В наших экспериментах внесение  $H_2O_2$  в среду приводило к повышению экспрессии гена *katG*, как в контрольной культуре, так и в культурах, предобработанных исследуемыми субстанциями. Причем в культурах, предобработанных экстрактами, экспрессия *katG* была значительно выше, чем в культурах, предобработанных Серпистенем. Экспрессия гена *katE*, кодирующего гидропероксидазу II, после внесения  $H_2O_2$  возрастала примерно одинаково и в контрольной, и во всех опытных культурах. Следовательно, повышенный уровень каталазы-гидропероксидазы I, кодируемой геном *katG*, может быть одной из основных причин защитного действия экстрактов при пероксидном стрессе.

Ранее мы показали, что растительные полифенолы защищают бактерии *E. coli* от пероксидного стресса благодаря повышению экспрессии гена *katG* и, соответственно, активности каталазы НРІ [10]. Механизм действия полифенолов включал как их прооксидантные эффекты (способность к аутоокислению с образованием  $H_2O_2$ ), так и способность хелатировать внутриклеточное железо, уменьшая производство токсичных гидроксильных радикалов. Продукция низких доз  $H_2O_2$  при аутоокислении полифенолов способствует развитию адаптивного ответа, который снижает повреждающее действие перекиси водорода при последующем добавлении ее более высокой дозы. Мы измерили уровни полифенолов, а также радикалсвязывающую и хелатирующую активность экстрактов и Серпистена (табл. 2).

**Таблица 1.** Влияние исследуемых субстанций на экспрессию стрессовых генов и устойчивость бактерий *E. coli* к действию 4 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Штамм и условия	Контроль (ДМСО)		<i>S. coronata</i> (1S)		<i>S. coronata</i> (2S)		<i>Trigonella foenum-graecum</i>		Серпистен	
	μ, час <sup>-1</sup>	β-галактозидаза	μ, час <sup>-1</sup>	β-галактозидаза	μ, час <sup>-1</sup>	β-галактозидаза	μ, час <sup>-1</sup>	β-галактозидаза	μ, час <sup>-1</sup>	β-галактозидаза
<i>katG::lacZ</i> до H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.94±0.05	109 ±14(1.0)	0.91±0.04	171 ±11 *(1.57)	0.93±0.03	157 ±16(1.44)	1.0±0.05	229 ±18*(2.1)	0.93±0.03	171 ±12 *(1.57)
<i>katG::lacZ</i> 30 мин после H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.29 ±0.04 (1.0)	177±22	0.59 ±0.04 *(2.03)	411±44*	0.54 ±0.05 *(1.86)	398±36*	0.55 ±0.03 *(1.9)	383±30*	0.27±0.04 (0.93)	285±46
<i>sodA::lacZ</i> до H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.97±0.04	104 ±5(1.0)	0.98±0.03	209 ±20*(2.0)	0.99±0.04	161 ±9*(1.54)	0.73±0.03	197 ±15 *(1.89)	0.93±0.06	136 ±7*(1.31)
<i>sodA::lacZ</i> 30 мин после H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.31 ±0.02 (1.0)	280±18	0.75±0.04 *(2.42)	406±34*	0.61 ±0.04 *(1.97)	367±13*	0.63 ±0.04 *(2.03)	457±26*	0.39 ±0.03 (1.26)	299±22
<i>rpoS::lacZ</i> до H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.88±0.03	330±19	0.94±0.06	381±30	0.79±0.06	378±41	0.72±0.03	408±45	0.75±0.07	403±38
<i>rpoS::lacZ</i> 30 мин после H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.18 ±0.02 (1.0)	535±20	0.67 ±0.04 *(3.72)	410±23*	0.59 ±0.07 *(3.28)	367±26*	0.61 ±0.02 *(3.39)	391±29*	0.18 ±0.02 (1.0)	508±23
<i>katE::lacZ</i> до H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.93±0.03	693±29	0.93±0.03	752±43	1.0±0.03	747±60	0.77±0.02	950±100 *	0.93±0.02	702±54
<i>katE::lacZ</i> 30 мин после H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.29 ±0.02 (1.0)	1102±35	0.66 ±0.02 *(2.28)	1046±80	0.56 ±0.04 *(1.93)	1119±90	0.45 ±0.04 *(1.55)	1208±66	0.32 ±0.03 (1.1)	1171±71

Прим. Культуры *E. coli* NM3021 (*katG::lacZ*), NM3001 (*sodA::lacZ*), NM3041 (*rpoS::lacZ*) и NM3031 (*katE::lacZ*) выращивали 20 мин в присутствии ДМСО или исследуемых субстанций, а затем обрабатывали 4 мМ перекиси водорода. Степень защитного действия субстанций оценивали по скорости роста бактерий через 30 мин после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Уровень экспрессии генов определяли по активности β-галактозидазы в штаммах, несущих слияние промотора исследуемого гена со структурным геном β-галактозидазы. В скобках представлены отношения величин удельной скорости роста или активности β-галактозидазы в присутствии субстанций к контрольным значениям. Статистически значимые отличия отмечены звездочкой.

**Таблица 2.** Содержание полифенолов, радикалсвязывающая (по DPPH) и хелатирующая активность в исследуемых субстанциях

Экстракты	Полифенолы мкг/мг сух. экстракта	Связывание DPPH %	Хелатирование %
<i>S. coronate</i> (1S)	17.5 ± 0.2	52 ± 3	7 ± 0.1
<i>S. coronate</i> (2S)	14.4 ± 0.4	38 ± 2	33 ± 5
<i>T. foenum-graecum</i>	28.2 ± 0.2	53 ± 2	45.5 ± 1.7
Серпистен	6.3 ± 0.2	1.4 ± 0.5	0

Прим. 25 мг сухого экстракта растворяли в 1.5 мл ДМСО.

Для определения полифенолов использовали 10 мкл этих растворов.

Для определения хелатирующей способности - 60 мкл этих растворов.

Для определения радикалсвязывающей активности (по DPPH) – 100 мкл этих растворов.

Значения для полифенолов приведены в эквивалентах галловой кислоты.

Экстракты содержали значительное количество полифенолов и существенно превышали Серпистен по способности к связыванию радикалов DPPH и хелатированию железа. В целом протекторное действие экстрактов серпухи и пажитника при пероксидном стрессе у бактерий *E. coli* может быть в большей степени связано с содержанием полифенолов, чем экистероидов, что согласуется с ранее

полученными данными [11]. Авторы цитируемой работы показали, что флавоноидсодержащая фракция экстракта *S. coronata* была более эффективна в качестве антиоксиданта при перекисном окислении липидов, чем экистероидсодержащая фракция. Вместе с тем известно, что экистероиды могут проявлять антиоксидантные свойства, снижая перекисное окисление липидов у крыс и повышая ак-

тивность ферментов антиоксидантной защиты организма - каталазы и супероксиддисмутазы [12]. Интересно, что, несмотря на различия в используемой модели (бактерии и крысы), мы также наблюдали повышение экспрессии генов, кодирующих каталазу и супероксиддисмутазу при обработке бактерий Серпистеном. 20-гидроксиэкдизон в 1.33 раза повышал экспрессию гена *katG*, но не индуцировал экспрессию гена *sodA*. Механизмы повышения экспрессии антиоксидантных генов при действии экдистероидов нуждаются в дальнейших исследованиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашения 8114, гранта Президента РФ МК-1763.2012.4 для молодых ученых, а также гранта №12-И-4-2072 по Программе интеграционных проектов Президиума УрО РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lafont R. Recent Progress in Ecdysteroid Pharmacology // Теор. прикл. экология. 2012. № 1. С. 6-12.
2. Володин В.В., Матаев С.И. Экдистероидсодержащие растения – источники новых адаптогенов // Вест. биотех. физ.-хим. биологии. 2011. Т. 7. № 2. С. 52-59.
3. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor. 1972.
4. Smirnova G., Samoiloва Z., Muzyka N., Oktyabrsky O. Influence of plant polyphenols and medicinal plant extracts on antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* // J. Appl. Microbiol. 2012. V. 113. P. 192-199.
5. Kim H.-J., Chen F., Wang X., Chung H.Y., Jin Z. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 7691-7695.
6. Shyur L.-F., Tsung J.-H., Chen J.-H., Chiu C.-Y., Lo C.-P. Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan // Int. J. Appl. Sci. Eng. 2005. V. 3. P. 195-202.
7. Wu L.-C., Hsu H.-W., Chen Y.-C., Chin C.-C., Lin Y.-I., Ho J.A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya // Food Chem. 2006. V. 95. P. 319-327.
8. Smirnova G.V., Vysochina G.I., Muzyka N.G., Samoiloва Z.Y., Kukushkina T.A., Oktyabrsky O.N. Evaluation of antioxidant properties of medicinal plants using microbial test systems // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 2269-2276.
9. Oktyabrsky O., Vysochina G., Muzyka N., Samoiloва Z., Kukushkina T., Smirnova G. Assessment of antioxidant activity of plant extracts using microbial test systems // J. Appl. Microbiol. 2009. V. 106. P. 1175-1183.
10. Smirnova G.V., Samoiloва Z.Y., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress // Free Radic. Biol. Med. V. 46. P. 759-768.
11. Barthoria M., Zupkorb I., Hunyadia A., Gacsner-Baitz E., Dinyac Z., Forgó P. Monitoring the antioxidant activity of extracts originated from various *Serratula* species and isolation of flavonoids from *Serratula coronata* // Fitoterapia. 2004. V. 75. P. 162-167.
12. Хушбактова З.А., Царук А.В., Гукасов В.М., Сыров В.Н. Экспериментальная оценка действия фитоэкдистероидов на процессы перекисного окисления липидов печени крыс при проведении опытов in vitro и in vivo // Теор. прикл. экология. 2012. № 1. С. 31-34.

## THE INFLUENCE OF *SERRATULA CORONATA* AND *TRIGONELLA FOENUM-GRaecum* EXTRACTS ON RESISTANCE OF BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* TO PEROXIDE STRESS

©2013 K.V. Bezmaternykh<sup>1</sup>, S.O. Volodina<sup>2</sup>, V.V. Volodin<sup>2</sup>, Z.Y. Samoiloва<sup>1</sup>, G.V. Smirnova<sup>1</sup>, O.N. Oktyabrsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural branch of RAS, Perm

<sup>2</sup>Institute of Biology, Komi Sci. Centre, Ural branch of RAS, Syktyvkar

The influence of *Serratula coronata* and *Trigonella foenum-graecum* extracts and ecdisteroid-containing substance Serpisten on stress gene expression and resistance of bacteria *E. coli* to action of hydrogen peroxide was investigated. All the substances studied were shown to increase expression of antioxidant genes *katG* and *sodA*, encoding catalase-hydroperoxidase I and Mn-superoxidedismutase, respectively. The extracts of *S. coronata* and *T. foenum-graecum* protected bacteria against bacteriostatic doses of hydrogen peroxide, while Serpisten did not affect bacterial resistance to peroxide stress. Apparently, the observed protection was due to the extracts' content of polyphenols which demonstrated radical-scavenging, metal-chelating and prooxidant activities.

**Key words:** plant extracts, ecdisteroids, polyphenols, antioxidant genes, bacteria *Escherichia coli*, peroxide stress.

Ksenia Bezmaternykh, engineer, postgraduate student, e-mail: hydrargyrum@iegm.ru; Vladimir Volodin, Doctor of Biology, professor, head of laboratory, e-mail: volodin@ib.komisc.ru; Svetlana Volodina, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: volodina@ib.komisc.ru; Zoya Samoiloва, Candidate of Biology, researcher, e-mail: samzu@mail.ru; Galina Smirnova, Doctor of Biology, leading researcher, e-mail: smirnova@iegm.ru; Oleg Oktyabrsky, Doctor of Biology, professor, head of laboratory, e-mail: oktyabr@iegm.ru