

УДК 577.181.5

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ ОТВЕТ БАКТЕРИЙ *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida* И *Rhodococcus erythropolis* ПРИ ОБРАБОТКЕ АНТИБИОТИКАМИ

© 2024 г. И. С. Сазыкин¹, А. А. Плотников¹, О. Д. Лановая¹, К. А. Онасенко¹,
А. Е. Полиниченко¹, А. С. Мезга¹, Т. Н. Ажогина¹, А. Р. Лицевич¹, М. А. Сазыкина^{1, *}

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

*e-mail: samara@sfnu.ru

Поступила в редакцию 01.07.2023 г.

После доработки 07.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

В работе исследованы окислительные повреждения и уровень антиоксидантного ответа в клетках *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida* и *Rhodococcus erythropolis* под действием таких антибиотиков, как ампициллин, азитромицин, рифампицин, тетрациклин и цефтриаксон. Проведена оценка уровня карбоксилирования белков и перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионредуктазы (ГР) и уровня глутатиона через 3 и 6 ч после обработки бактерий антибиотиками. Установлено, что индукция СОД происходила раньше и являлась более активной, чем индукция каталазы. У *A. calcoaceticus* СОД индуцировалась совместно с карбоксилированием белков и, вероятно, защищала их от окислительных повреждений, а индукция каталазы коррелировала с ПОЛ. Отмечена положительная корреляция между активностью каталазы и содержанием глутатиона у *R. erythropolis*. Активность каталазы при воздействии исследованных антибиотиков возрастала незначительно и даже снижалась, что связано с незначительным уровнем ПОЛ у большинства прокариот. Вместе с тем низкая активность каталазы могла способствовать дестабилизации генома в результате окислительного стресса и усилению адаптивной эволюции бактерий.

Ключевые слова: окислительный стресс, окислительные повреждения, карбоксилирование белков, перекисное окисление липидов, антиоксидантный ответ, супероксиддисмутазы, каталаза, глутатион, глутатионредуктаза

DOI: 10.31857/S0555109924010049, **EDN:** HCUPXZ

В настоящее время крайне широкое и не всегда оправданное применение антибиотиков в медицинской и ветеринарной практике вызывает лавинообразное увеличение количества резистентных к ним штаммов. В связи с этим механизмы повреждения бактериальной клетки антибиотиками и механизмы ответной защиты клетки требуют детального и тщательного рассмотрения.

Основными механизмами действия противомикробных препаратов являются ингибирование синтеза белка, нуклеиновых кислот, клеточной стенки, метаболизма фолиевой кислоты и связывание с рибосомами [1].

Исследования последних десятилетий показывают, что в результате генетических мутаций обмен веществ микроорганизма может быть изменен таким образом, что блокируемые антибиотиком биохимические реакции больше не являются критичными для жизнедеятельности данного микроорганизма [2]. Вместе с тем многие из антибиотиков способны вызывать окислительный стресс у бактериальных клеток, что, наряду с прямым антимикробным действием препарата, усиливает

бактерицидный эффект. Окислительный стресс, при котором клетки производят химически активные соединения кислорода, вызывающие повреждение белков, ДНК, а также клеточной мембраны бактерий, происходит в клетках микроорганизмов под воздействием бактерицидных антибиотиков [3]. Ранее считалось, что антибиотики вызывают гибель бактериальных клеток за счет возникновения окислительного стресса. Однако современные исследования показывают, что окислительный стресс практически не обеспечивает летальный эффект, он может выступать в качестве бактериостатического агента [4]. Свободные радикалы повреждают клеточные мембраны посредством образования перекисей липидов. Вместе с тем окислительный стресс может способствовать развитию антибиотикорезистентности у бактерий, так как он способствует дестабилизации генома бактериальной клетки, повышает уровень мутагенеза, а также приводит к увеличению количества антибиотикорезистентных бактерий за счет механизма горизонтального переноса генов между организмами [5, 6]. В то же время в бактериальной клетке существуют

системы защиты клетки от окислительного стресса, ключевыми ферментами которых являются каталаза, различные пероксидазы и супероксиддисмутаза (СОД). В работе исследовано влияние антибиотиков разных классов и механизмов действия на такие параметры окислительного стресса, как уровень малонового альдегида и окислительной модификации белков, а также антиоксидантные системы, такие как каталаза, СОД, глутатион (GSH) и глутатионредуктаза (ГР).

Цель работы — изучение окислительного повреждения клетки и антиоксидантного ответа бактерий при воздействии антибиотиков.

МЕТОДИКА

В работе использовали бактериальные штаммы *Pseudomonas putida* и *Rhodococcus erythropolis* из коллекции лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета, а также штамм *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-10353. Штаммы бактерий культивировали в жидкой среде Лурия–Бертани (LB) следующего состава (г/л): NaCl — 10, пептон — 10, дрожжевой экстракт — 5. Исследуемые культуры вносили в жидкую питательную среду LB до достижения плотности 0.5×10^6 кл./мл и культивировали в шейкере–инкубаторе Innova 40R (“New Brunswick Scientific”, США) в течение суток при 30°C со скоростью перемешивания 200 об./мин. Через 24 ч добавляли один из исследуемых антибиотиков (тетрациклин, рифампицин, ампициллин, азитромицин и цефтриаксон). Антибиотики добавляли в концентрации, соответствующей МИК₅₀, минимальной ингибирующей концентрации, которая подавляет рост 50% бактерий, установленной опытным путем для каждого взятого в опыт штамма (табл. 1). Инкубирование проводили в течение 3 и 6 ч. В контрольный вариант антибиотик не добавляли.

Через 3 и 6 ч культивирования с антибиотиком биомассу бактериальных клеток осаждали центрифугированием из культуральной жидкости (КЖ) в течение 5 мин при 1700 g на центрифуге Mini Spin Plus (“Eppendorf”, Германия). Надосадочную

жидкость удаляли. Бактериальную биомассу растирали в фарфоровой ступке с жидким азотом для разрушения клеток. Разрушенные клетки ресуспендировали в 10 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7.4 (“Merck”, Германия). Полученный гомогенат клеток бактерий использовали для проведения биохимических исследований.

Концентрацию белка определяли методом Лоури.

Для определения уровня окислительной модификации (ОМ) белков использован метод Левина [7] в модификации Дубининой [8]. Интенсивность окислительной деструкции белков оценивали по уровню карбонильных производных.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) проводили по методике, приведенной в работе [9].

Активность каталазы (К.Ф. 1.11.1.6) определяли по методике Королюк [10], основанной на способности пероксида водорода образовывать стойкий окрашенный комплекс с солями молибдена.

Определение активности СОД (К.Ф. 1.15.1.1) осуществляли по методу Сироты [11]. СОД способна ингибировать процесс восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) при аутоокислении адреналина в адренохром в щелочной среде в условиях генерации супероксидного анион-радикала. За условную единицу (у.е.) активности СОД принимается 50%-ное ингибирование скорости восстановления НСТ.

Для определения количества GSH использовали метод, разработанный Элманом [12]. Определение активности ГР (К.Ф. 1.6.4.2) проводили с помощью метода Юсуповой [13].

Для статистической обработки результатов были использованы стандартные методы математической обработки. Величины доверительных интервалов были рассчитаны при $p < 0.05$; t -критерий Стьюдента был использован для оценки статистически значимых различий. Расчеты проводили при помощи Microsoft Office Excel. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) вычисляли с целью оценки зависимостей с использованием пакетов “corrplot” и “ggplot” (R Studio ver. 4.0).

Таблица 1. Содержание антибиотиков (мкг/мл) в питательной среде для выращивания исследуемых штаммов бактерий

Антибиотик	Концентрация в среде, мкг/мл		
	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>P. putida</i>	<i>R. erythropolis</i>
Ампициллин	100.00	100.00	100.00
Азитромицин	12.50	1.25	1.25
Рифампицин	100.00	100.00	100.00
Тетрациклин	1.25	1.25	1.25
Цефтриаксон	12.5	1.25	1.25

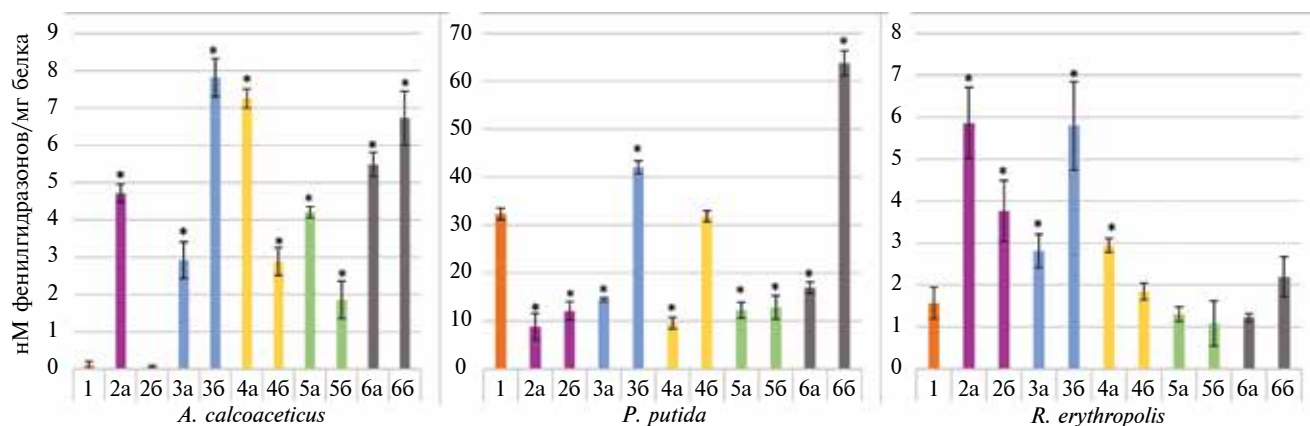


Рис. 1. Содержание карбонильных групп (нМ фенолгидразонов/мг белка) в белках исследуемых штаммов бактерий после обработки антибиотиками: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Карбоксилирование белков. Содержание карбонильных групп в белках исследуемых микроорганизмов после обработки антибиотиками представлены на рис. 1. Уровень ОМ белков *A. calcoaceticus* для большинства антибиотиков имел тенденцию к уменьшению при увеличении времени инкубации, что может быть связано с работой антиоксидантной системы данных бактерий [14] и с выработкой устойчивости к действию данных антибиотиков [15]. Однако при воздействии ампициллина и цефтриаксона показатели ОМ белков выросли в 2.5 и 1.5 раза соответственно, что свидетельствует о высоком уровне вызванного ими окислительного стресса. Результаты карбоксилирования белков *A. calcoaceticus* схожи с данными, полученными в работе [16], в которой изучались механизмы, вызывающие гибель *E. coli* под действием различных классов антибиотиков (β -лактамы, аминогликозиды, хинолоны), в том числе и окислительный стресс.

Низкие ОМ белков в клетках *P. putida* можно объяснить тем, что основной спектр действия взятых для исследования воздействия антибиотиков — грамположительные микроорганизмы [17–19], тогда как *P. putida* относится к грамотрицательным [20]. Данный вид бактерий обладает развитыми системами антиоксидантной защиты, так как в естественной среде эти микроорганизмы часто подвержены воздействию соединений, вызывающих окислительный стресс. Следовательно, выживание и успешное распространение *P. putida* связано со способностью вырабатывать адаптивные механизмы для предотвращения повреждений клеточных структур, производимых АФК [21].

Полученные с использованием штамма *P. putida* результаты схожи с данными работы [22] по исследованию *Burkholderia cepacia*. Эти грамотрицательные бактерии также подвергали воздействию

различных антибиотиков. Рост ОМ белков либо был незначителен (в 1.5 раза), либо не превышал контрольные значения.

У *R. erythropolis* при увеличении времени воздействия ряда антибиотиков заметна тенденция уменьшения ОМ белков, примерно в 1.5 раза. Вероятно, это связано индукцией антиоксидантной системы в бактериальных клетках [23, 24]. Напротив, для ампициллина и цефтриаксона, с увеличением времени инкубации с антибиотиками с 3 до 6 ч, уровень карбоксилирования белков увеличивался в 2 раза. При этом для цефтриаксона при 6-часовой экспозиции превышение уровня ОМ белков над контролем было незначительным — в 1.4 раза. Низкий уровень ОМ белков в результате действия цефтриаксона может быть связан с тем, что бактерии рода *Rhodococcus* относятся к грамположительным бактериям, а основной спектр действия цефтриаксона — грамотрицательные бактерии [17].

Результаты воздействия исследуемых антибиотиков на родококк схожи с результатами, полученными в работе [25]. Исследователями была изучена восприимчивость 20 штаммов бактерий (в том числе *R. erythropolis*) к пяти различным антибиотикам (тетрациклин, эритромицин, ампициллин, левофлоксацин и ципрофлоксацин). В результате исследования были сделаны выводы, что *R. erythropolis* является одним из наиболее устойчивых к антибиотикам среди исследованных бактерий, что объясняется высокой продуктивностью работы его антиоксидантной системы.

Уровень перекисного окисления липидов. На рис. 2 приведены результаты определения МДА после обработки исследуемыми антибиотиками. У *A. calcoaceticus* и *R. erythropolis* в присутствии большинства исследуемых антибиотиков уровень ПОЛ был ниже уровня контроля. У *P. putida* снижение ПОЛ относительно контроля отметили для

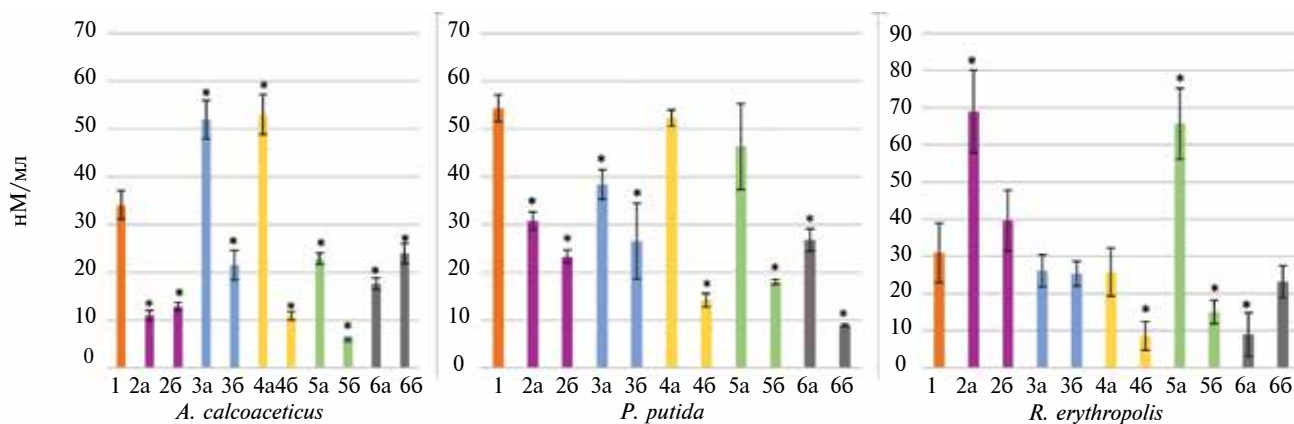


Рис. 2. Перекисное окисление липидов (МДА, нМ/мл) у исследуемых штаммов бактерий после обработки антибиотиками: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

всех использованных антибиотиков, что, вероятно, можно объяснить высокой устойчивостью этого микроорганизма к окислительному стрессу [26].

При воздействии большинства антибиотиков (за исключением воздействия цефтриаксона на *R. erythropolis*) отмечалась тенденция снижения ПОЛ с увеличением времени инкубации. При этом цефтриаксон не оказывал существенного влияния на уровень ПОЛ всех исследуемых штаммов. Возможно, это объясняется тем, что цефтриаксон является антибиотиком, который более эффективен против анаэробных бактерий [27], тогда как все исследуемые штаммы являются аэробами.

Необходимо отметить, что существует общая для большинства прокариотических клеток причина сравнительно низкого уровня ПОЛ при окислительном стрессе. Перекисное окисление липидов — универсальный процесс, свойственный эукариотам. У бактерий ПОЛ возникает гораздо реже, поскольку в этот процесс вовлечены в основном полиненасыщенные

жирные кислоты, тогда как клетки прокариот преимущественно содержат насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты [23]. ПОЛ относится к цепным реакциям, поскольку продукты, образующиеся в ходе этого процесса (липопероксид-радикалы), являются высокоактивными веществами, способными забирать электроны у соседних липидов, что приводит к образованию новых липопероксид-радикалов. Одним из негативных последствий окислительного стресса является перекисидация липидов клетки, которая приводит к снижению текучести мембраны, ухудшению работы ионных каналов, рецепторов, мембранных протеинов, а также изменению проницаемости мембран для различных молекул и ионов (K^+ , Ca^{2+} и т.д.) [28]. Таким образом, в присутствии антибиотиков в бактериальной клетке возникает окислительный стресс, вследствие чего индуцируется антиоксидантная защита [5, 29], которая, в свою очередь, снижает уровень ПОЛ. Уменьшение величины ПОЛ вследствие увеличения времени инкубации бактерий с антибиотиками также подтверждает предположение о его взаимосвязи

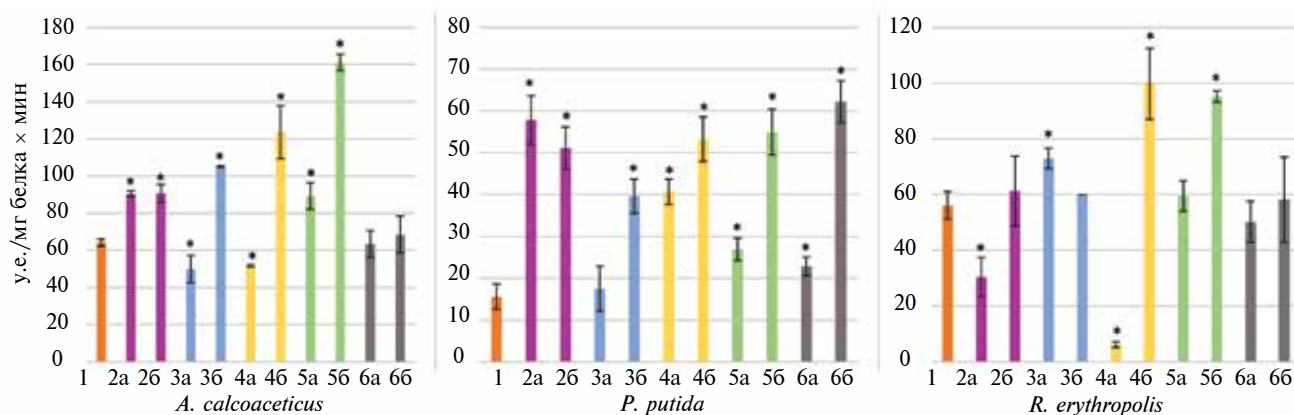


Рис. 3. Активность СОД (у.е./мг белка × мин) при воздействии антибиотиков на исследуемые штаммы бактерий: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

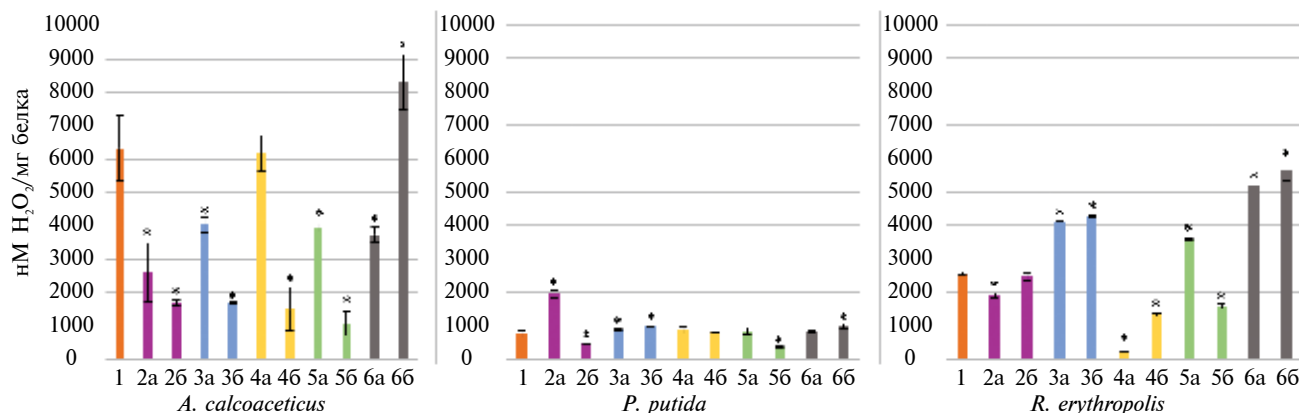


Рис. 4. Активность каталазы (нМ H₂O₂/мг белка) при воздействии антибиотиков на исследуемые штаммы бактерий: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

с усилением работы антиоксидантной системы бактериальной клетки.

Оценка активности СОД. Результаты измерения активности СОД при воздействии антибиотиков представлены на рис. 3.

Большинство использованных антибиотиков у всех исследованных штаммов индуцировали образование СОД (даже в случае первоначального падения активности), что подтверждалось результатами других исследователей [30, 31]. Для *P. putida* и *A. calcoaceticus* наиболее эффективной была индукция 6 ч. Исключением являлся азитромицин, который сильнее влиял на активность СОД *P. putida* при инкубации в течение 3 ч и в равной степени индуцировал образование СОД *A. calcoaceticus* при инкубации в течение 3 и 6 ч, что согласовывалось с чувствительностью культуры к данному антибиотику [32, 33].

Оценка активности каталазы при инкубации с антибиотиками. Результаты измерения активности каталазы при воздействии антибиотиков представлены на рис. 4.

Активность бактериальной каталазы увеличилась под действием цефтриаксона у всех исследованных штаммов микроорганизмов, ампициллина — у *P. putida* и *R. erythropolis*, азитромицина — *P. putida*, тетрациклина — *R. erythropolis*. Однако в большинстве случаев была отмечена тенденция к снижению активности каталазы относительно контроля, что может быть связано с уязвимостью данного фермента к действию некоторых использованных антибиотиков или же со слабой продукцией каталазы у исследуемых штаммов [34].

Изменение количества глутатиона в бактериальной клетке при воздействии антибиотиков. Изменение количества глутатиона под действием исследованных антибиотиков представлено на рис. 5. Концентрация глутатиона в клетках *A. calcoaceticus* повышалась в присутствии азитромицина при экспозиции 3 ч. При этом дальнейшее падение его концентрации и отсутствие достоверных отличий от контроля при экспозиции 6 ч может быть связано с чувствительностью данного микроорганизма

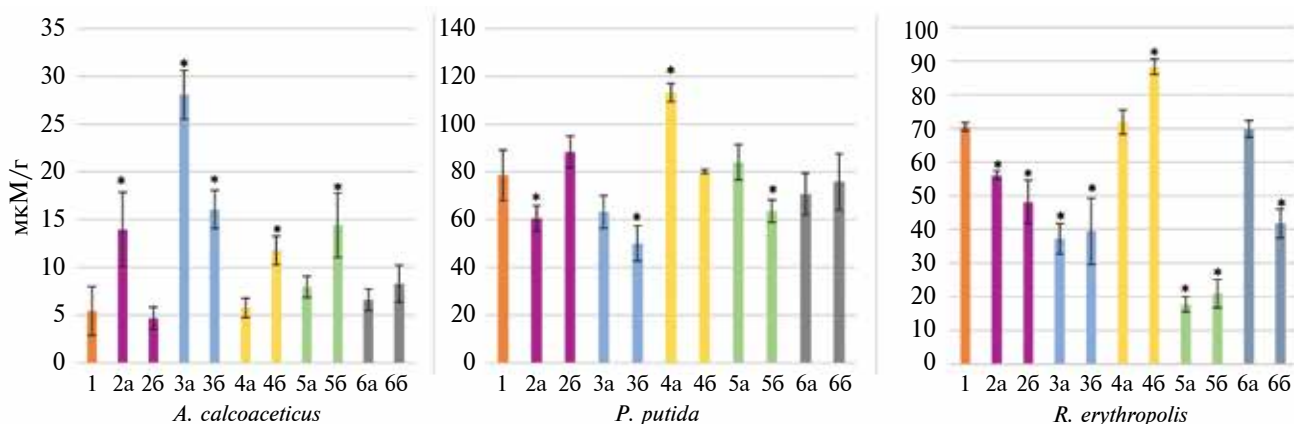


Рис. 5. Концентрация глутатиона (μM GSH/г белка) при воздействии антибиотиков на исследуемые штаммы бактерий: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

к азитромицину. Так, в статье Рецема с соавт. [32] сообщается, что азитромицин подавляет *A. calcoaceticus* (минимальная концентрация, необходимая для ингибирования 90% клеток (МИК₉₀), равна 4 мкг/мл). При воздействии ампициллина, рифампицина и тетрациклина наблюдали увеличение уровня глутатиона в клетках *A. calcoaceticus*. В присутствии цефтриаксона изменения концентрации глутатиона не зарегистрировано.

Под действием азитромицина, ампициллина и цефтриаксона достоверных изменений концентрации глутатиона в клетках *P. putida* не наблюдали. Слабое положительное влияние оказал рифампицин при экспозиции 3 ч. При воздействии рифампицина в течение 6 ч влияния на активность глутатиона также не было отмечено. Усиления синтеза глутатиона не происходило, вероятно потому, что это не способствует выживанию бактерий рода *Pseudomonas* в присутствии по крайней мере некоторых антибиотиков. Так, исследования, проведенные Чжан и Дуань [35] на модели родственного вида *P. aeruginosa*, свидетельствуют о том, что GSH повышает чувствительность бактерии к тетрациклину и не изменяет чувствительность к ампициллину.

В опытах с *R. erythropolis* азитромицин, ампициллин, тетрациклин и цефтриаксон снизили количество глутатиона в клетке. При инкубации в течение 6 ч с рифампицином концентрация глутатиона незначительно возросла.

Оценка активности глутатионредуктазы. Изменение активности глутатионредуктазы под воздействием антибиотиков представлено на рис. 6.

Все исследованные антибиотики, за исключением рифампицина, либо снижали, либо существенно не изменяли активность ГР *A. calcoaceticus*. При инкубации с рифампицином активность ГР возросла более чем в четыре раза. Такие результаты согласуются с данными исследований Дашнер и Фрэнк

[36], которые оценили влияние ампициллина, сульбактама и их комбинации на штаммы *Acinetobacter* spp., в том числе на *Acinetobacter calcoaceticus*. Авторы пришли к выводу, что исследуемые штаммы были более устойчивы к действию ампициллина (МИК = 64 мг/л), по сравнению с МИК (1 мг/л), рассчитанной для сульбактама. Также опубликованы данные о резистентности *A. calcoaceticus* к цефтриаксону (МИК₉₀ = 25мкг/мл) [37].

Для *P. putida* было отмечено снижение активности ГР под воздействием всех исследованных антибиотиков, за исключением азитромицина, не показавшего достоверных отличий от контроля. В работе Эль-Барбари и Хэл [38] *P. putida* отнесен к штаммам, обладающим средним уровнем чувствительности к азитромицину. Коникуат с соавт. [39] отмечают частое использование азитромицина при лечении внутрибольничных инфекций, вызванных близкородственным к исследуемому нами виду бактерий *P. aeruginosa*. Результаты тестов на чувствительность к антибиотикам различных представителей рода *Pseudomonas*, включая *P. putida*, выделенных из охлажденного мяса птицы, показали, что большинство штаммов не обладали чувствительностью к цефтриаксону [40], что согласуется с результатами для GSH (экспозиция 6 ч) и ГР (3 и 6 ч), полученными в настоящей работе.

При инкубации *R. erythropolis* со всеми исследованными антибиотиками активность ГР значительно возрастала. Однако при экспозиции в течение 3 ч с рифампицином и в течение 6 ч с тетрациклином экспрессия ГР *R. erythropolis* была полностью подавлена. Это может свидетельствовать о чувствительности антиоксидантной системы к воздействию исследованных антибиотиков, в первую очередь к азитромицину и цефтриаксону.

В работе [41] описан штамм *Rhodococcus opacus* PD630, чувствительный к ампициллину. Также были обнаружены штаммы *Rhodococcus*, проявившие

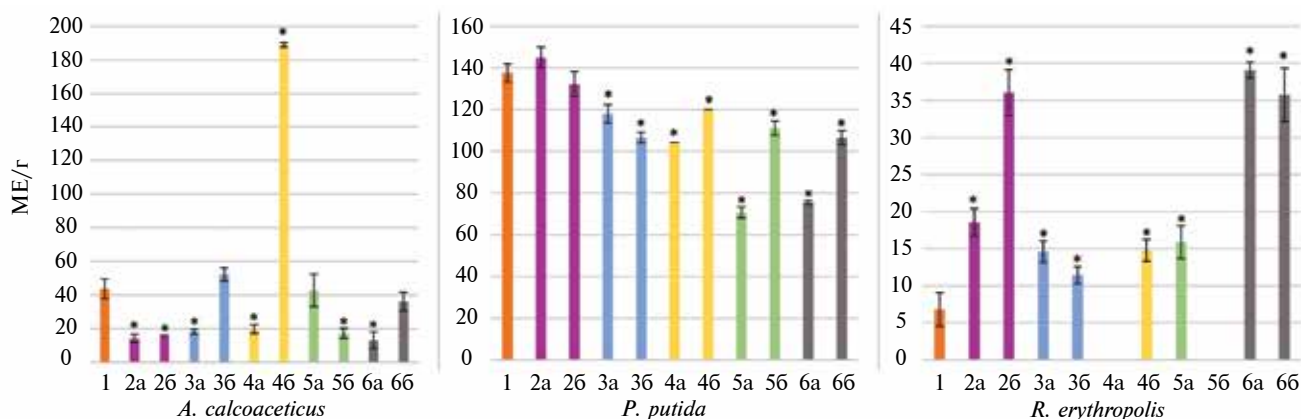


Рис. 6. Активность глутатионредуктазы (МЕ ГР/г белка) при воздействии антибиотиков на исследуемые штаммы бактерий: 1 — контроль, без антибиотика; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

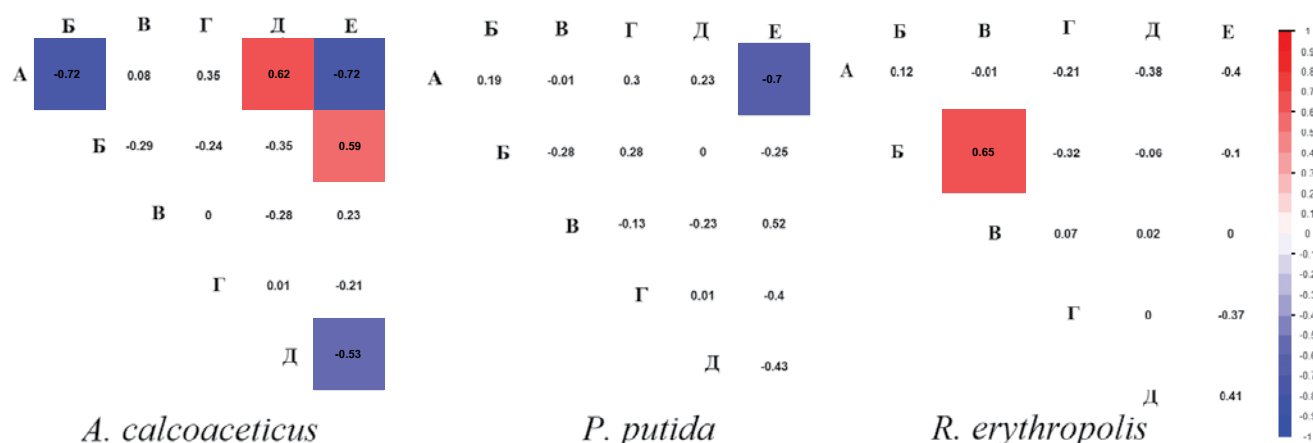


Рис. 7. Корреляция между активностью ферментов антиоксидантной защиты и окислительными повреждениями компонентов бактериальной клетки у исследуемых штаммов (достоверные значения выделены цветом, $p < 0.05$). А — СОД, Б — каталаза, В — GSH, Г — ГР, Д — карбоксилирование белков, Е — ПОЛ.

устойчивость к ампициллину [42]. В работе Ямщикова с соавт. [43] рифампицин был определен одним из наиболее эффективных антибиотических агентов в отношении различных видов *Rhodococcus*. Однако некоторые исследователи предполагают, что резистентность видов *Rhodococcus* различается в различных географических регионах. Это связывается с различиями антибиотиков, используемых для лечения домашних животных в этих регионах. По данным Макнил и Браун [44], устойчивость к рифампицину наблюдалась менее чем у 5% клинических изолятов *Rhodococcus*, а в другой работе [45] отмечена устойчивость у 40% клинических изолятов, что связано с широким применением рифампицина для лечения и профилактики инфекций у животных.

Таким образом, согласно полученным результатам, наиболее активированной антибиотиками антиоксидантной системой из четырех рассмотренных, является СОД. Он непосредственно воздействует на супероксид радикал, образующийся при окислительном стрессе. Кроме того, активность СОД непосредственно связана с активностью каталазы, так как продукт реакции первого фермента (пероксид водорода) является субстратом для второго. Каталаза может индуцироваться в клетке позже СОД, когда образуется достаточное количество пероксида, что также согласуется с полученными результатами, так как в большинстве случаев каталаза проявляла наибольшую активность при 6-часовой экспозиции с антибиотиками. С другой стороны, в бактериальной клетке в стрессовых условиях возможен, и даже вероятен, дисбаланс ферментативных активностей СОД и каталазы, что приводит к дестабилизации генома и ускорению эволюции в процессе адаптации к новым и токсичным субстратам [5].

Взаимосвязь между активностью ферментов антиоксидантной защиты и окислительными повреждениями компонентов бактериальной клетки. На рис. 7

представлены коэффициенты корреляции между активностью ферментов антиоксидантной защиты и окислительными повреждениями компонентов бактериальной клетки для трех исследуемых штаммов. Достоверные коэффициенты корреляции выделены цветом. Можно наблюдать лишь небольшое количество корреляционных зависимостей между активностью ферментов антиоксидантного комплекса и уровнем окислительных повреждений. Вероятно, это связано как со сложным взаимодействием компонентов антиоксидантной защиты, так и с комплексным действием антибиотиков на клетку. Кроме того, необходимо учитывать, что в защите и устранении последствий повреждения белков в ходе окислительного стресса участвуют белки-шапероны [46], которые могут снижать уровень окислительных модификаций белков.

Исследуемые ферменты не могли в полной мере защитить клетку от образования карбонильных производных белков, так как они образуются в результате не только прямой реакции с АФК, но и в результате катализируемой металлами окислительной атаки боковых цепей аминокислот пролина, аргинина, лизина и гистидина [47], защиту от которой исследуемые ферменты обеспечить не могут. Также не стоит исключать того, что влияние на уровень окислительных модификаций белков могут оказывать и другие факторы.

При воздействии антибиотиков на *A. calcoaceticus* была обнаружена прямая корреляция между активностью супероксиддисмутазы и уровнем карбонилирования белков (рис. 7). Можно предположить, что окислительные модификации белков происходят в результате супероксидного стресса с одновременной индукцией СОД. Это может свидетельствовать о возможной значительной роли СОД в антиоксидантной защите данного штамма. Схожие результаты были получены и в работе Хайндорф с соавт. [31] при изучении биологической роли СОД.

Исследователи инактивировали ген AIS_2343, кодирующий предполагаемую СОД, в результате чего мутантные штаммы оказались значительно более восприимчивы к окислительному стрессу.

Достоверных коэффициентов корреляции между уровнем карбоксилирования белков и активностью исследуемых ферментов у *P. putida* и *R. erythropolis* обнаружено не было (рис. 7).

У *A. calcoaceticus* и *P. putida* была обнаружена значимая отрицательная корреляция между активностью СОД и уровнем ПОЛ. Вероятно, ПОЛ у исследуемых микроорганизмов активируется при пероксидном стрессе, когда индукция СОД не происходит. При этом у *A. calcoaceticus*, одновременно с усилением ПОЛ, активируется и каталаза (рис. 7). Исходя из полученных данных, уровень ПОЛ в большинстве случаев снижался со временем — от экспозиции 3 ч к экспозиции 6 ч, и, предположительно, каталаза являлась наиболее значимым ингибитором ПОЛ. О достаточно сложном взаимодействии и временной динамике работы различных компонентов антиоксидантной системы исследуемых бактерий свидетельствуют также обнаруженная отрицательная зависимость между активностью каталазы и СОД у *A. calcoaceticus* и положительная корреляция между активностью каталазы и содержанием глутатиона у *R. erythropolis* (рис. 7).

Таким образом, проведенные исследования показали, что из четырех рассмотренных антиоксидантных систем бактерий первым уровнем защиты от окислительного стресса, вызываемого антибиотиками, является СОД, так как она вступала в действие через наиболее короткий промежуток времени после внесения антибиотика в культуру, то есть максимум активности в среднем СОД проявляла в первые 3 ч после инкубации. Через 6 ч эффективность данной системы снижалась, при этом повышалась активность каталазы, инактивирующей пероксид водорода, образующийся в результате действия СОД. Такая антиоксидантная система как глутатион—глутатионредуктаза активировалась в присутствии антибиотиков гораздо менее эффективно, по сравнению с СОД и каталазой.

Настоящее исследование окислительного стресса, возникающего у бактерий под действием антибиотиков, показало, что для получения более ясного и детального представления о бактериостатических и бактерицидных механизмах, необходимо более глубокое изучение всей полноты биохимических процессов, происходящих в микробной клетке под действием антимикробных препаратов. Такие работы также помогут прояснить пути адаптации бактерий к подобным соединениям. Особую актуальность подобные исследования приобретают в свете стремительно распространяющейся в настоящее время резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoneyama H., Katsumata R. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006. V. 70. № 5. P. 1060–1075.
2. Фурман Ю.В., Артюшкова Е. Б., Анисанов А. В. // Актуальные проблемы социально-гуманитарного и научно-технического знания. 2019. № 1. С. 1–3.
3. Пескин А.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. № 12. С. 1571–1578.
4. Imlay J.A. // Cur. Opin. Microbiol. 2015. V. 24. P. 124–131.
5. Sazykin I.S., Sazykina M. A. // Gene. 2023. V. 857. P. 147170. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147170>
6. Goyal A. // iScience. 2022. V. 25. № 5. P. 104312.
7. Levine R.L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A. G. et al. // Methods Enzymol. 1990. V. 186. P. 464–478.
8. Дубинина Е.Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов Г. Е. // Вопросы медицинской химии. 1995. Т. 41. № 1. С. 24–26.
9. Стальная И.Д., Гаршивили Т. Г. // Современные методы в биохимии. 1977. Т. 2. № 3. С. 66–68.
10. Королюк М. А., Иванова Л. К., Майорова И. Г., Токарева В. А. // Лабораторное дело. 1988. № 4. С. 44–47.
11. Сирота Т.В. // Вопросы медицинской химии. 1999. Т. 45. № 3. С. 263–272.
12. Ellman G.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70–77.
13. Юсупова Л.Б. // Лабораторное дело. 1989. Т. 4. № 19–21. С. 13.
14. Wanarska E., Mielko K. A., Maliszewska I., Młynarz P. // Sci. Rep. 2022. V. 12. № 1. P. 1913.
15. Shin B., Park C., Park W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. T. 104. C. 1423–1435.
16. Belenky P., Ye J. D., Porter C. B., Cohen N. R., Lobritz M. A., Ferrante T. et al. // Cell Rep. 2015. V. 13. № 5. P. 968–980.
17. Brogden R.N., Ward A. // Drugs. 1988. V. 35. № 6. P. 604–645.
18. Постникова Л.Б., Соодаева С. К., Климанов И. А., Кубышева Н. И., Афиногенов К. И., Глухова М. В., Никитина Л. Ю. // Пульмонология. 2017. V. 27. № 5. P. 664–671.
19. Куликова Н. А. // Международный студенческий научный вестник. 2017. № 4–5. С. 614–615.
20. Weimer A., Kohlstedt M., Volke D. C., Nikel P. I., Wittmann C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 7745–7766.S
21. Nikel P. I., Fuhrer T., Chavarría M., Sánchez-Pascuala A., Sauer U., de Lorenzo V. // ISME J. 2021. V. 15. № 6. P. 1751–1766.
22. Van Acker H., Gielis J., Acke M., Cools F., Cos P., Coenye T. // PloS One. 2016. V. 11. № 7. e0159837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159837>

23. Pátek M., Grulich M., Nešvera J. // *Biotechnol. Adv.* 2021. V. 53. P. 107698.
24. Urbano S. B., Di Capua C., Cortez N., Farías M. E., Alvarez H. M. // *Extremophiles*. 2014. V. 18. P. 375–384.
25. Meireles A., Faia S., Giaouris E., Simões M. // *Biofouling*. 2018. V. 34. № 10. P. 1150–1160.
26. Ren X., Zou L., Holmgren A. // *Curr. Med. Chem.* 2020. V. 27. № 12. P. 1922–1939. <https://doi.org/10.2174/0929867326666191007163654>
27. Cleeland R., Squires E. // *Am. J. Med.* 1984. V. 77. (4C). P. 3–11.
28. Mourenza Á., Gil J. A., Mateos L. M., Letek M. // *Antioxidants*. 2020. V. 9. № 5. P. 361.
29. Aguilera J., Rautenberger R. // *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. 2011. P. 58–71. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch4>
30. Martins D., McKay G., Sampathkumar G., Khakimova M., English A. M., Nguyen D. // *PNAS*. 2018. V. 115. № 39. P. 9797–9802.
31. Heindorf M., Kadari M., Heider C., Skiebe E., Wilharm G. // *PloS One*. 2014. V. 9. № 7. P. e101033.
32. Retsema J., Girard A., Schelkly W., Manousos M., Anderson M., Bright G. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987. V. 31. № 12. P. 1939–1947.
33. Mirzaei R., Mesdaghinia A., Hoseini S. S., Yunesian M. // *Chemosphere*. 2019. V. 221. P. 55–66.
34. Ramanathan S., Arunachalam K., Chandran S., Selvaraj R., Shunmugiah K. P., Arumugam V. R. // *J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 125. № 1. P. 56–71. <https://doi.org/10.1111/jam.13741>.
35. Zhang Y.N., Duan K. M. // *Sci. China C Life Sci.* 2009. V. 52. № 6. P. 501–505.
36. Daschner F.D., Frank U. // *Infection*. 1989. V. 17. № 4. P. 272–274.
37. Gnann Jr J. W., Goetter W. E., Elliott A. M., Cobbs C. G. // *Antimicrob. Agents Chemother* // 1982. V. 22. № 1. P. 1–9.
38. El-Barbary M.I., Hal A. M. // *J. Aquac. Res. Development*. 2017. V. 8. № 7. P. 1–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000499>
39. Konikkat S., Scribner M. R., Eutsey R., Hiller N. L., Cooper V. S., McManus J. // *PLoS genetics*. 2021. V. 17. № 7: e1009634. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009634>
40. Elbehiry A., Marzouk E., Aldubaib M., Moussa I., Abalkhail A., Ibrahem M. et al. // *AMB Express*. 2022. V. 12. № 1. P. 53. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01390-1>
41. Plaggenborg R., Overhage J., Loos A., Archer J. A. C., Lessard P., Sinskey A. J. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. № 4. P. 745–755.
42. Stancu M. M. // *J. Environ. Sci. (Shina)* 2014. V. 26. № 10. P. 2065–2075. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.08.006>
43. Yamshchikov A.V., Schuetz A., Lyon G. M. // *Lancet Infect. Dis.* 2010. V. 10. № 5. P. 350–359.
44. McNeil M.M., Brown J. M. // *Eur. J. Epidemiol.* 1992. V. 8. № 3. P. 437–443.
45. Asoh N., Watanabe H., Fines-Guyon M., Watanabe K., Oishi K., Kositsakulchai W. et al. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. № 6. P. 2337–2340.
46. Vaubourgeix J., Lin G., Dhar N., Chenouard N., Jiang X., Botella H. et al. // *Cell Host & Microbe*. 2015. V. 17. № 2. P. 178–190.
47. Nyström T. // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 7. P. 1311–1317.

Oxidative Damage and Antioxidant Response of *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus erythropolis* Bacteria during Antibiotic Treatment

I. S. Sazykin^a, A. A. Plotnikov^a, O. D. Lanovaya^a, K. A. Onasenko^a, A. E. Polinichenko^a,
A. S. Mezga^a, T. N. Azhogina^a, A. R. Litsevich^a, and M. A. Sazykina^{a, *}

^a*Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090, Russia*

**e-mail: samara@sfedu.ru*

In this work, oxidative damage and the level of antioxidant response in *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*, and *Rhodococcus erythropolis* cells under the influence of such antibiotics as ampicillin, azithromycin, rifampicin, tetracycline, and ceftriaxone were studied. The level of protein carboxylation and lipid peroxidation (LPO), as well as the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione reductase (GR), and the level of glutathione 3 and 6 hours after antibiotic treatment of bacteria were assessed. It is observed that SOD induction occurs earlier and is more active than catalase induction. In *A. calcoaceticus*, SOD is induced together with protein carboxylation and probably protects them from oxidative damage, while catalase induction correlates with LPO. A positive correlation is also noted between catalase activity and glutathione content in *R. erythropolis*. Catalase activity increases insignificantly and even decreases under the studied antibiotics influence, which is associated with an insignificant level of lipid peroxidation in most prokaryotes. On the other hand, low catalase activity can contribute to genome destabilization as a result of oxidative stress and enhance the adaptive evolution of bacteria.

Keywords: oxidative stress, oxidative damage, protein carboxylation, lipid peroxidation, antioxidant response, superoxide dismutase, catalase, glutathione, glutathione reductase, bacteria, antibiotics