

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии  
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

*На правах рукописи*



Багапова Рида Радимовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ  
ЭКСТРАКТОВ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ**

Научный руководитель:  
д.б.н профессор  
кафедры фундаментальной  
и прикладной микробиологии



Ан. Х. Баймиев

Уфа-2021

**Оглавление**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	3
--	---

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1    Значение антибиотиков .....	8
1.2    Лекарственные растения.....	11
1.3    Механизмы действия лекарственных растений .....	15
1.4    Известные механизмы действия антибиотиков на бактерии .....	22
1.5    Антибиотикорезистентные штаммы и поиск новых антибиотиков .....	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	29
1.1    Объекты исследования .....	29
2.2    Использованные реактивы .....	29
2.3    Оборудование .....	29
2.4    Приготовление спиртовых экстрактов лекарственных растений.....	31
2.5    Приготовление жидкой среды для культуры $\Delta$ TolC <i>E.Coli</i> .....	31
2.6    Приготовление твердых питательных сред .....	31
2.7    Приготовление дисков с экстрактами растений.....	32
2.8    Метод высокопроизводительного скрининга.....	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	34
3.1    Антибактериальная активность спиртовых экстрактов .....	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	38
ВЫВОДЫ.....	40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	41

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота

*E.coli* - *Escherichia coli*

РНК - Рибонуклеиновая кислота

## ВВЕДЕНИЕ

Открытие антибиотиков кардинальным образом изменило терапию инфекционных заболеваний. Однако широкое применение антибактериальных препаратов в медицинской практике и других сферах деятельности человека явилось причиной потери ими былой эффективности. Устойчивость к антимикробным препаратам составляет глобальную проблему, требующую безотлагательных действий, как со стороны медицинского сообщества, так и общества в целом. В статье сообщается об истории открытия и внедрения в широкую клиническую практику антимикробных препаратов; об устойчивости бактерий к лекарственным препаратам и других проблемах антибиотикотерапии; о путях решения проблем антибиотикорезистентности, расходов и смертности [1].

Антибиотики используются для профилактики и лечения бактериальных инфекционных заболеваний. Устойчивость к антибиотикам развивается в случае изменения бактерий в ответ на применение этих препаратов.

Устойчивость к антибиотикам развивается у бактерий, а не людей или животных. Эти бактерии могут заражать людей и животных, и вызванные ими инфекции лечить труднее, чем инфекции от бактерий, не имеющих такой устойчивости.

Следствием устойчивости к антибиотикам являются рост медицинских расходов, более продолжительные госпитализации и рост смертности [40].

Необходимо срочно изменить порядок назначения и использования антибиотиков во всем мире. Даже в случае разработки новых препаратов серьезная угроза устойчивости к антибиотикам будет сохраняться, если поведение не изменится. Изменение поведения должно также включать меры по сокращению распространения инфекций с помощью вакцинации, мытья рук, более безопасного секса и надлежащей гигиены питания [35].

Антибиотики являются одним из ключевых открытий XX века, без которых сложно представить современную жизнь. Но постоянное возникновение резистентных (устойчивых ко многим антибиотикам) штаммов бактерий приводит к необходимости постоянной разработки новых лекарств. В настоящее время новые исследования могут занимать годы, и их проведение становится нерентабельным для фармацевтических компаний. Поэтому необходима разработка современных методов поиска антибиотиков нового класса.

Растения используются для получения лекарственных препаратов, для лечения и профилактики различных заболеваний. На сегодняшний день известно, что более одной трети препаратов, применяемых для лечения, изготавливается из растений по данным Государственного реестра лекарственных средств МЗ РФ [21-23]. А в фитотерапии в целом используется приблизительно две тысячи видов растений [24]. Но человечество использует далеко не все биоразнообразие лекарственных растений, в связи с недостатком данных о ресурсах, химическом составе и малой изученностью свойств фитопрепаратов [27].

Одной из актуальных проблем в биологической и медицинской науке является поиск новых источников лекарственных компонентов растительного происхождения, что позволило бы расширить ассортимент лекарственных препаратов, изготовленных из растений. Растительное сырье содержит различные классы химических соединений, которые широко используются в медицине для получения различных лекарственных препаратов. В разных областях науки растения используют для получения больших количеств вторичных метаболитов. Поиск антибактериальных соединений растительного происхождения является перспективной задачей современной биологии.

### **Цель исследования**

Выявление антибактериальной активности экстрактов лекарственных бобовых растений и определение их механизма антимикробного действия с использованием метода высокопродуктивного скрининга.

### **Задачи исследования**

1. Провести литературный анализ и выбрать лекарственные растения, проявляющие антибактериальные свойства.
2. Выбрать подходящие методы для получения экстрактов для каждого выбранного растения.
3. Провести проверку антибактериальных свойств полученных экстрактов по ингибированию роста бактерий.
4. Провести анализ механизма действия антибактериальных экстрактов на платформе ВПС.

### **Методы и материалы**

#### Материалы

1. В качестве объекта исследования взяты корни, стебли и листья лекарственных растений.
2. Для выявления антибактериальной активности будет использоваться штамм  $\Delta TolC$  *E.coli*.

#### Методы

1. Анализ литературных данных и сбор лекарственных растений из семейства Fabaceae.
2. Приготовление спиртовых экстрактов лекарственных растений.
3. Приготовление питательных сред для культивирования бактерий.
4. Приготовление ночной культуры бактерий TolC *E.Coli*.
5. Равномерный рассев культур TolC *E.Coli* на твердой питательной среде.

6. Приготовление фильтровальных дисков с экстрактами растений.
7. Анализ антибактериальных действий экстрактов методом ВПС.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Значение антибиотиков

В данной статье рассматривается история и свойства антибиотиков. Они обладают широким спектром противомикробного действия по сравнению с другими химическими веществами. В древнем Египте, Китае и Индии плесневелый хлеб использовали для дезинфекции, прикладывая к ранам и гнойникам. В дальнейшем стали получать природные и полусинтетические антибиотики, меняя структуру природных, а отдельные из них получать путем полного химического синтеза. Эффекты они реализуют множеством способов: одни препятствуют синтезу нуклеиновых кислот микробов; другие препятствуют синтезу клеточной стенки бактерий, третьи нарушают синтез белков, а четвертые блокируют функции дыхательных ферментов [44]. Антибиотики – химиотерапевтические вещества биологического происхождения, избирательно угнетающие жизнедеятельность микроорганизмов. Существуют различные принципы классификации. В зависимости от источников получения, разделяются группы: полусинтетические, получаемые в результате модификации структуры природных, и природные (биосинтетические), продуцируемые микроорганизмами и низшими грибами [2].

По химическому строению выделяют следующие группы:

1. 3-лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы).
2. Макролиды и близкие к ним антибиотики.
3. Аминогликозиды.
4. Тетрациклины.
5. Полимиксины.
6. Полиены (противогрибковые).
7. Препараты хлорамфеникола (левомицетина).
8. Гликопептидные.

9. Антибиотики разных химических групп. По типу действия делятся на бактерицидные и бактериостатические.

Бактерицидное действие характеризуется тем, что под воздействием антибиотика наступает гибель микроорганизмов. Бактерицидный эффект важен при лечении ослабленных пациентов, и при заболевании такими тяжелыми инфекционными болезнями, когда организм не в состоянии самостоятельно бороться с инфекцией. Пенициллины, стрептомицин, неомицин, канамицин, ванкомицин, полимиксин обладают бактерицидным действием.

При бактериостатическом действии гибель микроорганизмов не наступает, но происходит прекращение их роста и размножения. Сейчас сложно представить жизнь без антибиотиков, но мало кто знает, когда и как появился первый из них. В 1928 г. британский ученый Александр Флеминг обнаружил колонии стафилококковых культур, которые он оставил в лабораторных чашках, заражены штаммом плесени *Penicillium Notatum*. Флеминг заметил область вокруг пятен плесени, где бактерий не было. Он сделал вывод о том, что плесень вырабатывает вещество, убивающее бактерии, ученый назвал его "пенициллином". Флеминг недооценил открытие, предположив, что получить лекарство будет очень трудно. Его работу продолжили ученые Говард Флори и Эрнст Чейн. В 1940 г. они выделили препарат в чистом виде и изучили его терапевтические свойства. 12 февраля 1941 г. инъекция пенициллина впервые была сделана человеку. Пациентом Флори и Чейна стал лондонский полицейский, умиравший от заражения крови. После нескольких инъекций ему стало лучше, однако запас лекарства быстро закончился, и больной скончался. В 1943 г. Говард Флори передал технологию получения нового препарата американским ученым, в США наладили массовое производство антибиотика. В 1945 г. Александр Флеминг, Говард Флори и Эрнст Чейн были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине[36]. Изобретение пенициллина –

величайшее открытие в медицине, ставшее настоящей революцией. Ранее ученые выводили подобные формулы антибиотиков, но по стечению обстоятельств, их открытия забылись. В 1896 г. итальянский врач Бартоломео Гозио, когда изучал причины поражения риса плесенью, вывел формулу антибиотика, схожего с пенициллином. Так как он не смог найти практическое использование нового лекарства, его открытие забылось. Но на этом все не закончилось. В 1897 г. французский военный врач Эрнест Дюшен заметил, что арабские конюхи лечат раны лошадей плесенью собранную с сырых седел лошадей. Дюшен внимательно изучил плесень и выявил ее разрушающее действие на палочку брюшного тифа. Результаты своих исследований не были признаны. В 1913 г. американские ученые Карлу Альсбергу и Отису Фишеру Блэку получили кислоту из плесени, обладающую противомикробными свойствами, но исследования были прерваны с началом Первой мировой войны. Каждый школьник знает, что до эпохи Новейшего времени продолжительность жизни была очень низкой. Если человек доживал до тринадцати лет, то он уже считался долгожителем, а процент детской смертности достигал невероятных значений. Роды были опасными: инфицирование организма роженицы и смерть от сепсиса считалась обычным осложнением, и лекарств от неё не было. Люди воевали во все времена, и, конечно, все не обходилось без ранений [37]. Из-за отсутствия лекарств это приводило к смерти. В то время можно было умереть от незначительных повреждений конечностей, так как это приводило к заражению крови (в дальнейшем – к смерти). Но несмотря на все это, еще с древних времен люди знали, что некоторые продукты обладают целебными свойствами в отношении инфекционных заболеваний. Так, ещё 2500 лет назад в Китае для лечения гнойных ран использовали забродившую соевую муку, а ещё раньше индейцы майя применяли плесень с особого вида грибов с той же целью. В Египте заплесневевший хлеб являлся прототипом современных антибактериальных средств еще со времён строительства пирамид. В

случае ранения повязки с ним значительно повышали шанс выздоровления. Использование плесневых грибов имело практический характер пока учёные не заинтересовались теоретической стороной вопроса. Но до изобретения антибиотиков в их современном виде было ещё далеко. Подводя итоги, можно сказать о том, что антибиотики играют большую роль как в медицине, так и в жизни каждого человека. Сложно представить, что было бы сейчас если бы их не изобрели. Возможно, люди продолжали погибать от незначительных ран (которые приводили к заражению крови и далее к смерти). Сейчас мы можем только предполагать, так как антибиотики уже появились и изменили нашу жизнь.

## **1.2 Лекарственные растения**

### Лекарственные растения Башкортостана

На территории нашей республики произрастают очень большое количество видов лекарственных растений. Это древесные, кустарниковые и травянистые растения. В нашей местности в районе села Пелево встречаются многие из них. Из деревьев берёза повислая, дуб обыкновенный, липа сердцевидная, рябина обыкновенная; кустарники - черемуха обыкновенная, шиповник коричный, калина обыкновенная, малина обыкновенная; более пятидесяти видов травянистых растений, такие как василёк синий, горец птичий, душица обыкновенная, зверобой продырявленный, земляника лесная, крапива двудомная, мать-и-мачеха, одуванчик лекарственный пастушья сумка, первоцвет весенний, пижма обыкновенная, подорожник большой, полынь горькая и др. Среди них есть и охраняемые виды: кубышка желтая, ландыш майский [3].

Многие из этих лекарственных растений используют в моей семье, их используют так же многие жители.

### Как собирать и сушить лекарственные растения

Собирая лекарственные растения, нужно это делать так, чтобы в сырье сохранилось максимальное количество физиологически активных веществ и, кроме того, чтобы после заготовки сырья популяция

лекарственных растений сохранили способность к восстановлению. Если не соблюдать этих требований, сбор лекарственного сырья превратится в простое расхищение природных богатств.

Существует определенные правила сбора лекарственных растений.

Лучшее время для сбора почек — весна, когда почки набухли, но не лопнули. В это время они особенно богаты смолами и другими действующими веществами [4].

Кору собирают обычно тоже весной во время сокодвижения. Ее снимают с трех-четырёхлетних стволов и ветвей. При этом делают кольцевидные и продольные надрезы, после чего кору отслаивают и снимают.

Листья лучше собирать в начале цветения растения или незадолго до него. Надземную часть растения, так называемую «траву», чаще всего рекомендуется собирать во время цветения.

Цветы или соцветия берут в начале цветения, а не во время второй его половине, когда они начинают подвядать, плоды — только совершенно зрелыми, при этом, разумеется, не надо собирать поврежденные или гнилые плоды.

Листья, побеги и цветы можно собирать только в сухую погоду, после того, как сойдет роса: растения, собранные после дождя или покрытые росой, не удастся правильно высушить — они почернеют и испортятся [5]. Собирают листья, побеги и цветки только здоровых растений. Нельзя также собирать растения в местах загрязненных (например, у скотных дворов), на полях, где проводилась обработка гербицидами или недавно вносились минеральные удобрения, вблизи промышленных предприятий — словом, везде, где полученное сырье может быть загрязнено вредными органическими или минеральными веществами.

Помня об этом, нужно максимально соблюдать общие правила сбора растений: побеги (траву) и цветки многолетних травянистых растений не

срывать, а срезать, так как, срывая их, мы можем выдернуть растение или, во всяком случае, повредить его корни. Лишь однолетники можно срывать или даже выдергивать из почвы, но обязательно не все подряд — несколько экземпляров нужно оставлять для обсеменения. Выкапывать корни и корневища следует только у взрослых растений — молодые надо оставлять для возобновления популяции [9]. Почки и особенно кору нужно заготавливать лишь на лесосеках при проведении рубок ухода, со срубленных экземпляров. Плоды собирают только вручную — все механические приспособления повреждают растения. Разумеется, собирая плоды или цветки, нельзя обламывать ветки. И главное, помните — растениям необходим отдых. Ежегодно проводить заготовки на одном и том же месте нельзя. И никогда не надо брать больше необходимого [6].



Рисунок 1 — Сбор и сушка растений

### Как использовать лекарственное сырье

Успех лечения во многом зависит от правильного приготовления из растительного сырья лечебных препаратов. Для этого мы должны извлечь из сырья действующие вещества. Обычно их извлекают или спиртом (готовят так называемые настойки) или водой. В домашних условиях

проще всего готовить водные извлечения — настои и отвары. Для приготовления их необходимы определенные знания. Так, например, из листьев и цветков действующие вещества легко экстрагируются после обыкновенного заваривания кипятком и настаивания, вот кору и корни, чтобы извлечь действующие вещества, нужно кипятить.

Некоторые лекарственные формы и правила их приготовления.

Настои — водные вытяжки действующих веществ. Готовят их, заваривая измельченное сырье кипятком, обычно в соотношении 2 чайные ложки на стакан воды. Настаивают 15-30 мин в закрытой посуде, удобнее всего в термосе, а затем процеживают. Иногда, если сырье содержит эфирное масло или слизи, настоек готовят, заливая сырье кипяченой водой комнатной температуры и настаивают 6-8 часов.

Отвары — тоже водные вытяжки. Их готовят, нагревая залитое водой сырье на кипящей водяной бане в закрытой посуде в течении 30 мин. Затем отвар охлаждают и процеживают.

Принимать отвары и настои надо холодными или теплыми. Например, потогонные настои принимают теплыми. Чтобы улучшить вкус настоев, к ним можно добавить немного сахара или меда. Однако сильно подслащивать, особенно при желудочно-кишечных заболеваниях, не рекомендуется.

Настойки — вытяжки, полученные с помощью 70°-ного спирта или водки в соотношении 1:5 или 1:10. Настаивают в хорошо закрытом сосуде, защищенном от действия солнечных лучей, в течении 7 дней при комнатной температуре.

Экстракты — это сгущенные вытяжки из лекарственного сырья. Они бывают жидкими или сухими. Методы их получения довольно сложны, поэтому в домашних условиях их обычно не готовят.

Когда нужно еще больше усилить комплексность действия разных веществ, готовят настои и отвары не из одного, а из нескольких видов растений, хорошо дополняющих друг друга. Это так называемые «чай»,

или «сборы». Например, желчегонный чай из цветков бессмертника, листьев мяты и вахты или успокоительный чай из корневища валерианы, листьев мяты, «шишек» хмеля. Все настои, отвары, чаи годны к употреблению в течение двух дней, если они хранятся при комнатной температуре [10].



Рисунок 2 — настои, отвары

### 1.3 Механизмы действия лекарственных растений

#### Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.)

Большинство лечебных свойств фасоли связано с присутствием в семенах этой культуры полифенолов, которые обладают антиоксидантными свойствами и различной биологической активностью, включая антидиабетическую, противовоспалительную, противомикробную, противоопухолевую, гепатопротекторную, кардиозащитную, нефропротекторную, нейропротекторную и остеопротекторную [25-26]. Регулярное употребление фасоли, содержащей общую и растворимую клетчатку, а также устойчивые крахмалы, снижает гликемический индекс у человека. Исследования показали, что фасолевыми диетами снижали уровень

«плохого холестерина», повышали «хороший» и положительно влияли на факторы риска метаболического синдрома, тем самым уменьшая вероятность появления кардиозаболеваний, диабета, ожирения. Исследование пищевых пристрастий японцев, шведов, греков и австралийцев старшего возраста (от 70 лет), показало, что фасоль – это один из немногих продуктов, употребление которого связано с системным снижением риска смертности. Было замечено, что укрепляющие здоровье эффекты прямо пропорциональны увеличению количества съеданной фасоли [28-30]. Точнее, снижение коэффициента риска смертности на 8% происходило при увеличении суточного потребления фасоли на каждые 20 граммов (и с учетом и без учета этнической принадлежности). Потребление сушеной фасоли в значительной степени обуславливает многие физиологические и укрепляющие здоровье эффекты, в число которых входит профилактика сердечно-сосудистых заболеваний, ожирения, сахарного диабета и рака [38].

#### Донник лекарственный (аптечный) (*Melilotus officinalis* (L.)

Трава донника входит в состав смягчительных сборов для припарок, с помощью которых ускоряется рассасывание и вскрытие нарывов. Экстракт донника входил в состав донникового пластыря, применявшегося с этой же целью.

В народной медицине используют отхаркивающее, смягчительное, ветрогонное, болеутоляющее, успокаивающее свойства донника. Чаще всего лекарства из донника применяют при воспалительных заболеваниях органов дыхания, а также при повышенной возбудимости и бессоннице[15].

#### Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.)

В лекарственных целях применяются листья со стеблями, реже — корни. Но, чаще всего, в ход идут именно сами цветы.

Цветки календулы, благодаря высокой концентрации в них биологически активных веществ, очень благотворно влияют на состояние здоровья при:

- стоматите;
- холецистопанкреатите;
- невротических расстройствах;
- ангине;
- гепатите и так далее.

Календула оказывает антиспазматическое и антисудорожное воздействие.

Народные целители, и просто те, кто испробовал действие ноготков на себе, уверяют, что они спасают при болезненности селезенки, небольших камнях и песке в районе мочевого пузыря.

Повышенном артериальном давлении (как «разовом», так и хроническом), разной этиологии кашле, болях в желудке, а также — как внешнее средство при ожогах, механических травмах, свищах. Но это — далеко не единственное их целебное воздействие.

При стоматических язвах в ротовой полости, бактериальных поражениях горла (таких, как ангина, к примеру), очень здорово помогает свежий отвар на цветах ноготков.

Он используется в качестве жидкости для полоскания. Не устоят против него и дерматологические недуги, среди которых, особенно, следует обратить внимание на такие трудно поддающиеся лечению традиционными способами, как экзема и дерматит.

Для внутренних органов пищеварительной системы — печени и ее ближайшего «соратника и ключевого партнера» — желчного пузыря, календула подходит для приема внутрь, отлично восстанавливая физиологическое их состояние до нормального.

Считается, что народные средства из календулы проявляют свою эффективность в профилактике и лечении онкологических недугов: молочных желез, кожи и так далее.

Лучевая болезнь — еще одно направление, в котором действенность ноготков подтверждена.

Обезболивающее воздействие ноготков неплохо проявляется при головных болях и мигрени, сердечных и мышечных болях, недомогании в суставах.

Это растение способно останавливать несильные кровотечения, в том числе — носовые [15-16]. Если они возникают от повышенного артериального давления, то получается двойной эффект, так как оно и давление нормализует, и свертываемость крови повышает.

Отмечается положительное влияние средств из данного растения и на нервную систему: при бессоннице, повышенной раздражительности, отсутствии концентрации внимания, ухудшении памяти. Цветы календулы, лечебные свойства проявляют при ВСД и так далее.

При слабых волосах, их чрезмерной потере, сечении, тусклости и так далее, календулу используют для ополаскивания головы. Результаты — великолепные: волосы обретают второе дыхание, становясь здоровыми, крепкими и красивыми. И достичь этого можно уже через несколько недель после начала ополаскивания, если процедуры выполнять регулярно.

Календула известна своими свойствами: антимикробным, вяжущим, противовоспалительным, седативными. Она очищает кровь и лимфу.

При простуде, диарее, в качестве общеукрепляющего, улучшающего состояние иммунной системы, средства, она также рекомендована.

Популярным является рецепт примочек для глаз при проблемах воспалительного характера с ними. Для этого концентрированный отвар из ноготков, используют в качестве примочек.

Корни календулы используются в лечебных целях гораздо реже. Но, все-таки, иногда они тоже являются востребованными. Например, при гастрите или язве желудка они очень хорошо выручают.

И это, все, что приведено выше, — только основные направления, в которых календула является уместной к применению. На самом деле, их намного больше [7].

### Чина луговая (*Lathyrus pratensis* L.)

В народной медицине, преимущественно, используются лекарственные свойства травянистой части растения собранные в фазе цветения, реже готовят отвары корневища чины луговой. Настои и отвары травы чины рекомендуется употреблять при острых и хронических бронхитах, при воспалении легких, туберкулезе, кашле, а также для лечения нарывов. При правильном употреблении побочных эффектов от применения препаратов чины луговой не выявлено. Для этого готовят легкий отвар: 1 ч. ложка сушеной травы чины на стакан кипящей воды, залить кипятком, накрыть крышкой, настоять 30 минут, отжать и процедить. Употреблять по 1 ст. ложке каждые 2-3 часа для лечения бронхолегочных болезней и как отхаркивающее средство. Наружно отвар применяют для смачивания тампонов, прикладываемых к абсцессу [11].

Настои и отвары травы воздействуют на рецепторы дыхательной системы, что уменьшает кашель, отечность и способствует мягкому отхождению мокроты. Попутно наступает расслабление нервной системы и сонное состояние, поэтому чину назначают как седативное средство. Органы сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта лечат препаратами корневища чины луговой. Отвар корней чины хорошее средство от поноса, но может быть полезен в целом для лечения гастрита, колита, язвенной болезни желудка и кишечника, как средство расслабляющее гладкую мускулатуру внутренних органов.

Чина луговая обладает иммуностимулирующим действием, поэтому входит в травяные сборы, предназначенные для улучшения иммунитета, а жидкий экстракт чины улучшает активность лимфоцитов у раковых больных, поэтому может быть полезен при лейкозе. Противовоспалительные, противовирусные и антибактериальные свойства препараты чины обретают благодаря феруловой кислоте, которая содержится в чине в достаточных количествах [12]. Препараты чины луговой обезболивают и снимают отечность благодаря гликозидам (рутин,

ононин), поэтому применяются для лечения органов дыхательной системы. Кроме того, сочетание компонентов ускоряет течение бронхиальной астмы [8].

#### Люцерна посевная (*Medicago sativa*)

Люцерна оказывает на организм антимикробный, противовоспалительный, лимфодренажный, антиоксидантный эффект. Кроме этого, растению свойственно слабительное, общеукрепляющее, иммуномодулирующее, сахаропонижающее действие. Магний и кальций в составе способствуют быстрому выведению мочевой кислоты, которая становится причиной развития артритов и подагры. Трава широко используется в медицинской практике. Из разных частей растения готовят настои, отвары и сиропы. Экстракт люцерны способствует нормализации зрения, протекции нервной системы, повышению защитных свойств организма, очищению крови и восстановлению клеток печени. Входящие в его состав компоненты эффективны при лечении воспалительных заболеваний органов пищеварения. В составе люцерны много пищевых волокон, которые помогают оптимизировать холестериновый обмен, улучшить пищеварение. Растение обеспечивает профилактику инсультов, инфарктов и атеросклероза [13].

Калий, который находится в люцерне в большом количестве, помогает снизить артериальное давление, а железо в активной форме способствует предупреждению анемии и улучшает транспортировку кислорода и питательных веществ ко всем клеткам и органам [41].

#### Стальник полевой (*Ononis arvensis L*)

В народной медицине корни стальника с успехом применяются в качестве противовоспалительного, диуретического, желчегонного, обезболивающего и гомеостатического средства.

К применению в медицине разрешены отвар и настойка корней стальника. Для лечебных целей применяется настойка и водный отвар корней стальника полевого. Их применяют при геморрое в качестве

кровоостанавливающего, обезболивающего и слабительного средства. Кроме того, отвар и настой стальника оказывают эффективное мочегонное, дезинфицирующее и потогонное действие. Поэтому их часто рекомендуют для нормализации обмена веществ в организме, усиления работы желез внутренней секреции, растворения камней и устранения воспалительных заболеваний в почках и мочевыводящих путях [41]. Корень стальника также применяют при подагре, кожных заболеваниях, маточных кровотечениях различной этиологии, особенно в климактерический период. Экспериментально установлено, что корни стальника полевого повышают артериальное давление и увеличивают амплитуду сердечных сокращений, а также обладают кровоостанавливающим действием. Стальник полевой благодаря своим полезным свойствам входит в состав сборов, используемых для лечения многих заболеваний: ревматизма, хронического запора, недостаточности кровообращения, гломерулонефрита, геморроя, уретрита, цистита, простатита, мочекаменной болезни, дерматита, экземы и т.д [14].

#### Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra L.*)

Препараты, содержащие в своем составе активное действующее вещество растительного происхождения сухой экстракт корня солодки, включающий глицирризиновую кислоту и глицирризин, обуславливают следующие терапевтические эффекты:

Противовоспалительное действие, которое реализуется преимущественно в слизистой оболочке дыхательных путей.

Отхаркивающее действие, которое препарат оказывает за счет снижения вязкости мокроты и улучшения функциональной активности ресничек эпителия нижних дыхательных путей.

Иммуностимулирующее влияние – усиление активности клеток иммунной системы в структурах дыхательной системы.

Регенерирующее действие – действующие компоненты способствуют скорейшему восстановлению воспаленных тканей органов

системы дыхания. Спазмолитический эффект – снижение тонуса гладкой мускулатуры стенок бронхов, за счет чего расширяется их просвет и улучшается прохождение воздуха.

Противовирусное воздействие – компоненты сухого экстракта корня солодки обладают способностью подавлять репликацию (внутриклеточное удваивание генетического материала) некоторых вирусов, являющихся возбудителями острой респираторной патологии.

Также в последних исследованиях было выявлено противоопухолевое действие препаратов на основе корня солодки. Точных данных о фармакодинамике (всасывание в системный кровоток, распределение в тканях, метаболизм и выведение) действующих компонентов корня солодки на сегодняшний день нет [17].

#### **1.4 Известные механизмы действия антибиотиков на бактерии**

##### Механизм действия антибиотиков

По характеру действия антибиотики на бактерии их можно разделить на две группы: антибиотики бактериостатического действия и антибиотики бактерицидного действия. Бактериостатические антибиотики в концентрациях, которые можно создать в организме, задерживают рост микробов, но не убивают их, тогда как воздействие бактерицидных антибиотиков в аналогичных концентрациях приводит к гибели клетки. Однако в более высоких концентрациях бактериостатические антибиотики могут оказывать также и бактерицидное действие. К бактериостатическим антибиотикам относятся Макролиды, тетрациклины, левомицетин и др., а к бактерицидным - Пенициллины, цефалоспорины, ристоцетин, аминогликозиды и др [42].

За последние годы большие успехи были достигнуты в изучении механизма действия антибиотиков на молекулярном уровне. Пенициллин, ристомицин (ристоцетин), ванкомицин, новобиоцин, D-циклосерин нарушают синтез клеточной стенки бактерий, то есть эти антибиотики действуют лишь на развивающиеся бактерии и практически неактивны в

отношении покоящихся микробов. Конечным результатом действия этих антибиотиков является угнетение синтеза муреина, который наряду с тейхоевыми кислотами является одним из основных полимерных компонентов клеточной стенки бактериальной клетки [43]. Под воздействием этих антибиотиков вновь образующиеся клетки, лишенные клеточной стенки, разрушаются. После удаления антибиотиков микробная клетка, если она не погибла, вновь становится способной образовывать клеточную стенку и превращается в нормальную бактериальную клетку. Между этими антибиотиками не существует перекрестной устойчивости, потому что точки приложения их в процессе биосинтеза муреина различны. Так как все вышеперечисленные антибиотики поражают лишь делящиеся клетки, то бактериостатические антибиотики (тетрациклины, левомицетин), останавливающие деление клеток, снижают активность бактерицидных антибиотиков, а потому совместное их применение не оправдано [46].

Механизм действия других антибактериальных антибиотиков - левомицетина, макролидов, тетрациклинов - заключается в нарушении синтеза белка бактериальной клетки на уровне рибосом. Как и антибиотиков, подавляющие образование муреина, антибиотики, угнетающие синтез белка, действуют на различных этапах этого процесса и поэтому не имеют перекрестной устойчивости между собой.

Противогрибковые антибиотики полиены нарушают целостность цитоплазматической мембраны у грибковой клетки, в результате чего эта мембрана теряет свойства барьера между содержимым клетки и внешней средой, обеспечивающего избирательную проницаемость. В отличие от пенициллина, полиены активны и в отношении покоящихся клеток грибов. Противогрибковое действие полиеновых антибиотиков обуславливается связыванием их со стеринами, содержащимися в цитоплазматической мембране клеток грибов. Устойчивость бактерий к полиеновым антибиотикам объясняется отсутствием в их цитоплазматической мембране стерина, связывающихся с полиенами.

Противоопухолевые антибиотики, в отличие от антибактериальных, нарушают синтез нуклеиновых кислот в бактериальных и животных клетках. Антибиотики актиномицины и производные ауреоловой кислоты подавляют синтез ДНК-зависимой РНК, связываясь с ДНК, служащей матрицей для синтеза РНК. Антибиотик митамицин С оказывает алкилирующее действие на ДНК, образуя прочные ковалентные поперечные связи между двумя комплементарными спиралями ДНК, нарушая при этом ее репликацию. Антибиотик брунеомицин приводит к резкому угнетению синтеза ДНК и ее разрушению. Подавляющее действие на синтез ДНК оказывает и рубомицин. Все эти реакции являются, вероятно, первичными и основными в действии антибиотиков на клетку, так как они наблюдаются уже при очень слабых концентрациях препаратов. Антибиотики в больших концентрациях нарушают многие другие биохимические процессы, протекающие в клетке, но, по-видимому, это влияние антибиотиков имеет второстепенное значение в механизме их действия.

### **1.5 Антибиотикорезистентные штаммы и поиск новых антибиотиков**

Антибиотикорезистентность (нечувствительность или устойчивость возбудителей инфекционных болезней к антибиотикам) представляет собой одну из актуальных проблем современной фармакологии. Устойчивость бактерий к антибиотикам приводит к снижению эффективности методов лечения бактериальных заболеваний, увеличению заболеваемости и смертности и, в ряде случаев, к продолжительному бактерионосительству. Следует отметить, что антибиотики и антибиотикорезистентность возникли у микроорганизмов природных экосистем задолго до появления человека как естественные механизмы борьбы за существование. Так, в ходе метагеномных исследований бактериальных штаммов, выделенных из вечной мерзлоты, не подвергавшихся антропогенному воздействию, были обнаружены

плазмиды и транспозоны, определяющие их устойчивость к некоторым антибиотикам [45]. Исследования детерминанты резистентности у присутствующих в клинических изолятах бактерий, показали, что они развились, по крайней мере, из двух источников. Первый – это механизм самозащиты бактерий в среде от антибиотиков (например, стрептомицетов). Впоследствии гены, опосредующие такие защитные механизмы, распространились среди других микроорганизмов по последовательным этапам горизонтальной передачи и в конечном итоге были интегрированы в генотип многих грамположительных и грамотрицательных бактерий. Второй возможный источник их устойчивости включает гены, необходимые для нормального метаболизма бактериальной клетки, в том числе детерминанты кодирования для различных систем оттока. Высокая адаптивность бактерий и горизонтальный перенос генов способствовали как совершенствованию и поддержанию этих механизмов в популяциях, так и их распространению среди микроорганизмов, принадлежащих к различным таксонам. Внедрение антибиотиков и других эффективных антибактериальных средств в клиническую и ветеринарную практику, с одной стороны, позволило излечивать или как минимум снижать тяжесть многих инфекционных заболеваний, а с другой – создало условия для селекции устойчивых штаммов патогенных микроорганизмов [47]. Результат не замедлил сказаться уже в 1945 г., т.е. через считанные годы после начала массового применения пенициллина и сульфаниламидов появились первые статьи об устойчивости микроорганизмов к этим препаратам, а в 1946 г. – к стрептомицину. Столь явная проблема не могла не вызвать пристального внимания ученых и врачей. С тех пор во всем мире ведутся интенсивные исследования, направленные на изучение механизмов устойчивости к противомикробным препаратам и поиск средств противодействия этому явлению. Различают природную и приобретенную устойчивость микроорганизмов к антибиотикам. Природная (естественная или

первичная) устойчивость связана с тем, что микроорганизм не имеет структур, на которые действует антибиотик, ибо исходно вырабатывает ферменты, инактивирующие его (например, устойчивость микоплазм и псевдомонад к  $\beta$ -лактамным антибиотикам или бактерий к антигрибковым препаратам). Приобретенная антибиотикорезистентность возникает в результате модификации генома путем мутаций, а также – получения микробной клеткой таких мобильных генетических элементов как плазмиды и интегроны от других бактерий (горизонтального переноса генов). Эти гены могут распространяться не только среди патогенных бактерий, против которых направлена текущая антибактериальная терапия, но и среди представителей нормальной микрофлоры, которая впоследствии может модифицироваться и утрачивать свои полезные свойства [48]. Таким образом, микрофлора кишечника может служить потенциальным резервуаром генов резистентности и способствовать развитию устойчивости к антибиотикам других представителей микробиоты. Устойчивость бактерий к антибиотикам возникает, когда из множества бактерий хотя бы несколько оказываются устойчивыми к применяемому антибиотику. Антибиотики уничтожают чувствительных к ним патогенных бактерий и нарушают состав полезной микрофлоры, защищающей организм от инфекций. В результате происходит нарушение состава нормофлоры, что в итоге обуславливает дисбактериоз. Выжившие патогенные бактерии получают преимущество при отборе, что способствует росту их популяции. Они начинают усиленно размножаться и становятся причиной нового заболевания. Часть из них передает гены, обеспечивающие антибиотикорезистентность, другим бактериям, на которые данный антибиотик не подействует при повторном применении. Механизмы устойчивости бактерий к антимикробным средствам достаточно разнообразны, однако могут быть сведены в несколько категорий. К ним относятся отсутствие мишени антибиотика у бактерий данного вида/таксона (врожденная устойчивость), непроницаемость

клеточной стенки для антибиотика, метаболическая трансформация или деградация антибиотика ферментом, экспрессируемым бактерией, наличие систем выведения (эффлюкса), не дающих антибиотику достичь внутриклеточных мишеней, модификация исходно имевшейся у данного организма мишени антибиотика или использование альтернативного метаболического пути, позволяющего обойти его действие [50]. В настоящее время все эти механизмы достаточно хорошо изучены, и прилагаются большие усилия для их преодоления. Задача облегчается тем, что ни один из этих механизмов не является универсальным и не обеспечивает защиты от любых антибактериальных средств [18].

Скрининг природных веществ приводит к значительно большей вероятности обнаружения антибиотической активности [39], по-видимому, в связи с тем, что природные вещества имеют более широкий спектр стереоселективных фармакофоров, уже отобранных на различную биологическую активность в процессе эволюции. Метаболомика, лежащая в основе современных подходов к скринингу природных антибиотиков представляет собой совокупность тандемных методов разделения–анализа, таких, как высокоэффективная жидкостная хроматография–масс-спектрометрия или спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ВЭЖХ-МС или ВЭЖХ-ЯМР), и методов широкомасштабного секвенирования. Метаболомика позволяет осуществить переход к функциональной геномике, а также идентифицировать новые рибосомные и нерибосомные пептиды и вторичные метаболиты .

Природные источники, используемые для поиска антибиотиков, весьма разнообразны и включают в себя экстракты растений, грибов, лишайников, эндофитов, морских растений, водорослей, кораллов и микроорганизмов [49]. Тем не менее, следует отметить, что многие действующие вещества из перечисленных источников действуют по неспецифическому механизму дестабилизации мембраны, что, в свою очередь, затрудняет их применение ввиду высокой токсичности,

вызванной низким терапевтическим индексом. Таким образом, благодаря своему разнообразию и эволюционной предрасположенности к продукции антибиотиков для завоевания экологических ниш в процессе конкуренции друг с другом, бактерии продолжают оставаться одним из наиболее привлекательных источников антибиотической активности. Проблема «повторного открытия» антибиотиков может решаться с использованием разнообразных подходов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1.1 Объекты исследования

В данной работе объектами исследования являются лекарственные бобовые растения:

1. Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris L.*)
2. Донник лекарственный (*Melilotus officinalis*)
3. Календула лекарственная (*Calendula officinalis L.*)
4. Чина луговая (*Lathyrus pratensis L.*)
5. Люцерна посевная (*Medicago sativa*)
6. Стальник полевой (*Ononis arvensis L.*)
7. Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra L.*)
8. Астрагал шерстистоцветковый (*Astragalus dasyanthus*)

А также для сравнения лекарственные растения:

1. Подорожник (*Plantago*)
2. Клевер луговой (*Trifolium pratense*)
3. Ромашка (*Matricaria*)

Для выявления антибактериальной активности использовали штамм  $\Delta$ TolC *E.coli*.

### 2.2 Используемые реактивы

- Бакто-агар (Agar bacteriological);
- Бакто-триптон (Bacto tryptone);
- Натрий хлористый (NaCl);
- Дрожжевой экстракт (Yeast Extract);
- Этиловый спирт.

### 2.3 Оборудование

- Термостат;
- Автоклав горизонтальный электронной модели Dental League (Tuttnauer, Израиль);
- Ламинарный бокс;
- Электронные весы Electronic scale;

- Шкаф сушильный ШС-80-01 СПУ;
- ChemiDocMP Imaging System (BioRad, США);
- Спиртовка;
- Дозаторы;
- Пинцеты, микробиологические петли;
- Пробирки;
- Мерные цилиндры, колбы;
- Чашки Петри;

Термостат — прибор для поддержания постоянства температуры — применяют для выращивания культур микроорганизмов. Он представляет собой шкаф, в котором поддерживается в течение длительного времени определенная температура.

Сушильный шкаф используют для стерилизации сухим жаром посуды, инвентаря и т. д. Стерилизуемый материал предварительно заворачивают в бумагу и помещают в шкаф так, чтобы он не касался стенок. Стерилизацию проводят при температуре 160 °С в течение 2 ч. Простерилизованный материал вынимают после отключения и охлаждения шкафа.

Автоклав используют для стерилизации посуды и питательных сред паром под давлением. Это герметичный котел с двойными металлическими стенками и крышкой. Он снабжен манометром, предохранительными клапанами и краном для спуска воды и пара. Применяют для стерилизации питательных сред под давлением 0,5—1,0 МПа в течение 20—30 мин.

Весы в лаборатории необходимо иметь технические и аналитические. Технические имеют точность до 0,01 г; аналитические — до 0,001 г.

Ламинарный бокс (укрытие) — лабораторный прибор для работы с биологическими объектами в стерильных условиях. Представляет собой шкаф, оборудованный осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха.

Система визуализации ChemiDoc MP - это полнофункциональный прибор для визуализации и анализа гелей и вестерн-блоттинга, с мультиплексной флуоресценцией в диапазоне 400-900 нм от синего до ближнего инфракрасного света.

#### **2.4 Приготовление спиртовых экстрактов лекарственных растений**

Состав для приготовления:

- 1.250 мл спирта;
- 2. по 3 г сырья.

Настойки готовят на 70 и 40% спирте. Для приготовления спиртовых настоек измельченные растения помещают в сосуд, заливают спиртом, закупоривают и выдерживают при комнатной температуре в течение 7 суток. Через неделю настойку сливают, отжимают остатки растений и фильтруют.

#### **2.5 Приготовление жидкой среды для культуры $\Delta$ TolC *E.Coli***

Взвесить:

- 1 г триптона;
- 1 г дрожжевого экстракта;
- 0,5 г NaCl.

Растворить в 100 мл дистиллированной воде

Автоклавировать при 121 ° C в течение 20 минут

После охлаждения перемешать колбу, чтобы перемешать компоненты среды.

#### **2.6 Приготовление твердых питательных сред**

Приготовление питательной среды LB.

1. Взвесить:
  - 1 г триптона;
  - 2 г дрожжевого экстракта;
  - 0.5 г NaCl;
  - 1 г агар.

2. Растворить в 100 мл дистиллированной воды
3. Автоклавировать при 121 ° С в течение 20 минут
4. После охлаждения перемешать колбу, чтобы перемешать компоненты среды
5. Разлить среду по чашкам Петри
6. Дождаться застывания среды
7. Убрать в холодильник

Среды LB богаты питательными веществами и применяются для поддержания культуры *E. Coli*. Входящий в состав среды триптон служит источником азота и углерода, различных минералов и аминокислот, необходимых для роста *E. coli*. Дрожжевой экстракт является источником витаминов, в частности группы В и других метаболитов. Хлорид натрия поддерживает необходимое осмотическое давление. Бактериологический агар является желирующим агентом [31-34].

### **2.7 Приготовление дисков с экстрактами растений**

Диски (диаметр 5 мм) готовят из фильтровальной бумаги ЗМ.

Пронумеровав эти фильтровальные диски, поставили в автоклав на 20-30 минут.



Рисунок 3 — Фильтровальные диски

Каждый диск смачивали 20 мкл экстрактом растений. Давали подсохнуть. В дальнейшем диски использовали для экспериментов по выявлению антибактериального действия экстрактов.

## 2.8 Метод высокопроизводительного скрининга

Культивировали микроорганизм *E.coli* на среде Лурия-Бертани (LB) (бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%), NaCl (1%)).

Для этого взвешивали на аналитических весах все компоненты и смешивали их с водой. Затем ставили в автоклав.

Диски, предварительно вырезанные из фильтровальной бумаги, пропитывались определенным количеством экстрактов растений в течение 30 минут. Для получения равномерного бактериального газона на поверхность агара в чашку наливали 200 мкл используемую культуру микроорганизмов. Жидкость равномерно распределяли стерильными стеклянными шариками и подсушивали агар в ламинаре в течение 5 минут. Затем на поверхность агара на расстоянии 2 см от края чашки и на равном расстоянии друг от друга помещали пинцетом по одному бумажные пронумерованные диски, пропитанные экстрактами растений. Чашки помещали в термостат 37 °C на сутки.

Фотодокументирование чашки проводили на приборе ChemiDocMP Imaging System (BioRad, США) при длинах волн 602/50 нм для определения RFP, 700/50 нм для определения Katushka2S.

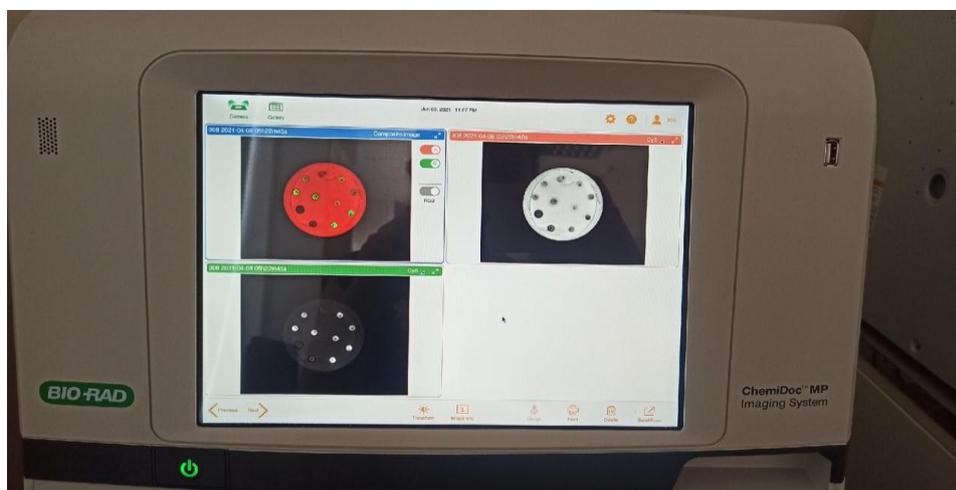


Рисунок 4 - ChemiDocMP Imaging System (BioRad, США).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Антибактериальная активность спиртовых экстрактов

Несмотря на большие успехи, достигнутые в лечении инфекционных заболеваний благодаря использованию антибиотиков, потребность в создании новых антибиотических препаратов чрезвычайно велика. Инфекционные заболевания по-прежнему остаются основной причиной смертности в развивающихся странах и серьёзной проблемой для развитых стран [51].

Источники поиска новых антибактериальных веществ весьма разнообразны: от химически синтезируемых веществ до природных активных компонентов, получаемых из живых организмов. Одним таким перспективным источником может служить растительное сырьё. Издревле известно, что целители использовали различные растения для избавления людей от множества недугов, вызванных также разными бактериальными инфекциями. И в настоящее время растения широко применяются в фарминдустрии.

Необходимым этапом в исследовании новых антибиотиков является установление механизма их действия, причем желательно быстро и дёшево, предпочтительно на этапе первичного скрининга. Нами в работе был использован репортерный штамм для быстрой классификации экстрактов растений по механизму антибактериального действия, не требующей определения строения анализируемых соединений [20].

Система представлена штаммом *E.coli* BW25113  $\Delta$ tolC с плазмидным вектором pRFP-sulA/Katushka2S-2Ala, который содержит гены двух флуоресцентных белков: RFP (максимум испускания 584 нм) и Katushka2S (максимум испускания 635 нм). В случае, если антибиотик действует на процесс синтеза белка, экспрессия Katushka2S возрастает. Экспрессия RFP увеличивается в случае включения в клетке SOS-ответа.

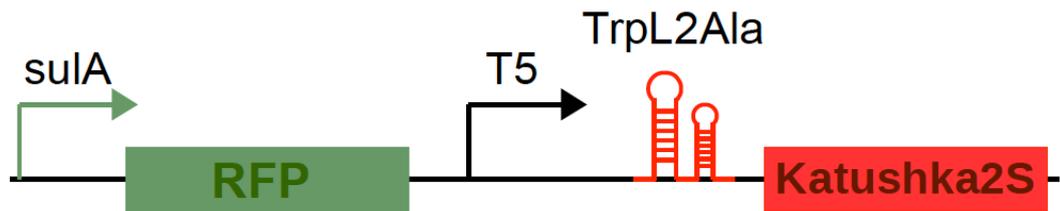


Рисунок 5 — Карта двойной репортерной системы.

Репортер ингибирования биосинтеза ДНК содержит ген красного флуоресцентного белка RFP под контролем промотора *sulA*. Репортер ингибирования трансляции содержит ген флуоресцентного белка *Katushka2S* в плюс области от модифицированного триптофанового аттенуатора под контролем строго конститутивного T5 промотора.

В качестве образцов для анализа в работу были взяты аптечные сборы бобовых растений таких, как:

1. Фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.)
2. Донник лекарственный (*Melilotus officinalis*)
3. Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) соцветия
4. Чина луговая (*Lathyrus pratensis* L.)
5. Люцерна посевная (*Medicago sativa*)
6. Стальник полевой (*Ononis arvensis* L) корень
7. Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.) корень
8. Астрагал шерстистоцветковый (*Astragalus dasyanthus*)
9. Подорожник большой (*Plantago major* L.)
10. Клевер луговой (*Trifolium pratense*)
11. Ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.)



Рисунок 6 — Аптечные сборы лекарственных растений

В работе использовали спиртовые экстракты растений (3г растений/20 мл спирта). Для исключения антисептического влияния спирта экстракты капали по 20 мкл на диски фильтровальной бумаги диаметром 5 мм. После подсушивания диски использовались для проведения опытов. Для этого на твердую питательную среду LB на чашке Петри высевали культуру клеток *E.coli* ровным слоем и на поверхность среды раскладывали диски фильтровальной бумаги, пропитанные экстрактами растений. Чашку инкубировали в течение суток в термостате при 37С. Фотодокументирование чашки проводили на приборе ChemiDocMP Imaging System (BioRad, США).

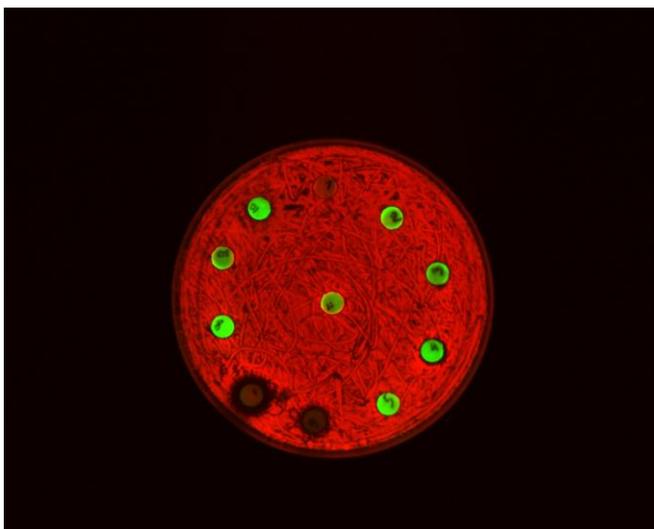


Рисунок 7 — Результат анализа антибактериальной активности исследуемых экстрактов растений.

Из изображения видно, что выраженной антибактериальной активностью обладает образец №7, соответствующий экстракту корня солодки. Ореол красного цвета вокруг диска говорит о том, что антибактериальное действие данного экстракта связано с подавлением синтеза белка. Кроме образца №7 антибактериальный эффект обнаруживается у образца №6 (Стальник полевой) и №4 (Чина луговая). При этом антибактериальное действие образца №4 также связано с ингибированием трансляции. Антибактериальное действие образца №6 определить не получилось, поскольку оно не связано ни с ингибированием трансляции, ни с ингибированием биосинтеза ДНК.

Таким образом, экстракты некоторых лекарственных растений могут служить источниками антибактериальных веществ. Полный механизм действия и природа этих компонентов пока не у всех растений известен, и поэтому растения могут быть источниками уникальных соединений, и интерес к ним будет только возрастать.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения используются в качестве лекарственных препаратов, для лечения и профилактики различных заболеваний. По данным Государственного реестра лекарственных средств МЗ РФ на сегодняшний день более одной трети препаратов, применяемых для лечения, изготавливается из растений [21]. А в фитотерапии в целом используется приблизительно две тысячи видов растений [24]. Но человечество использует далеко не все биоразнообразие лекарственных растений, в связи с недостатком данных о ресурсах, химическом составе и малой изученностью свойств фитопрепаратов [27]. На данный момент одной из актуальных проблем в биологической и медицинской науке является поиск новых источников лекарственного растительного сырья, что позволило бы расширить ассортимент лекарственных средств изготовленных из растений. В различных областях науки растения используют для получения больших количеств вторичных метаболитов. Растительные клетки обладают всеми качествами для продукции биологически активных сложных белков. Доля биологически активной формы в рекомбинантном белке, для синтеза которого были использованы растительные клетки, очень высока.

Исследование антибактериальных свойств экстрактов бобовых растений растущих в условиях *in vivo* будет полезно в науке и практике, а свойства этих растений в целом помогут сделать процесс более выгодным в промышленном плане. В ходе наших исследований удалось получить данные о высоком уровне антибактериальной активности экстрактов корня солодки, чины луговой, стальника полевого.

Растения, представители семейства Fabaceae, являются ценным лекарственным сырьем для лечения и профилактики различных заболеваний. Для многих растений химический состав не изучен или изучен недостаточно, в связи с чем до конца не выяснены лечебные свойства и механизмы лечебного воздействия на организм человека.

Поэтому в настоящее время растения-представители семейства Fabaceae, представляют интерес для ученых и продолжают активно изучаться.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружено антибактериальное действие спиртовых экстрактов трех видов бобовых растений: чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), стальника полевого (*Ononis arvensis* L) и солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).
2. Антибактериальное действие экстрактов чины луговой и солодки голой связано с ингибированием синтеза белков бактерий.
3. Показана высокая функциональность метода ВПС для обнаружения антибактериального действия экстрактов растений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лалаянц И. Э. Антибиотики — история далекая и не очень // В мире лекарств. 1999. N 3–4. С. 94–95.
2. Фармакология / Под ред. проф. Р.Н. Аляутдина. - 4-е изд., перераб. и доп. - 2008. Глава 37. Антибактериальные химиотерапевтические средства. с. 120. [Электронный ресурс] <https://studfile.net/preview/5792046/page:120/>. – (дата обращения: 29.05.2020).
3. Пастушенков Л.В., Пастушенков А.Л., Лекарственные растения: использование в народной медицине и быту. 7. Лениздат 344 с.,1990
4. Приходько С.М., Михайловская М.В. Знахарь в доме Цветы, которые лечат М. книги 281 с.1995.
5. Рабинович А.М. Лекарственные растения на приусадебном участке. Возделывание и применение в медицине и ветеринарии М. Издательский дом 336 с., 1994
6. Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.:МАКС Пресс. 2003. 120 с.
7. Семенихин Д.И. Биологические особенности роста и развития валерианы лекарственной, зверобоя продырявленного и пижмы обыкновенной в совместных посевах с однолетними культурами. Автореферат дисс. к.б.н. 06.01.1
8. А.П. Попов. Лекарственные растения в народной медицине. Киев, 1968. Федченко Б. А. Чина — *Lathyrus* // Флора СССР / Ботанический институт им.
9. В. Л. Комарова Академии наук СССР; Гл. ред. акад. В. Л. Комаров; Редакторы тома Б. К. Шишкин и Е. Г. Бобров. — М.—Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1948. — Т. XIII. — С. 479–520

10. Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Н., Отряшенкова В.Э. Химический анализ лекарственных растений: Учеб, пособие для фармацевтических вузов. Под ред. Гринкевич Н. И., Сафронич Л. Н.
11. Толстикова Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П., Кондратенко Р.М., Толстикова Т.Г. Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине.
12. Алтымышев А.А. Природные целебные средства. 2-е изд. – Фрунзе: Кыргызстан, 1990. – 352 с
13. Донник лекарственный: полезные свойства и противопоказания, рецепты применения. – Режим доступа: <http://zdravotvet.ru/donnik-lekarstvennyj-poleznye-svoystva-i-protivopokazaniyanarodnye-recepty>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. (Дата обращения: 30.10.2019).
14. Тулайкин А.И., Березина В.С., Гончаров М.Ю. // Растит. ресурсы. 2004. № 4. С. 73–79.
15. Филипцова, Г. Г. Основы биохимии растений / Г. Г. Филипцова, И. И. Смолич. – Минск : БГУ, 2004. – 110 с
16. Лекарственные свойства сельскохозяйственных растений / Под ред. к.ф.н. М.И. Борисова. – Мн.: Ураджай, 1974. – 336 с.
17. Государственная Фармакопея СССР. Одиннадцатое издание / МЗ СССР. - Вып.2. - М.: Медицина, 1990. - 325-326 с
18. Давитавян Н.А., Сампиев А.М. // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы 8 Междунар. съезда. 21–23 июня 2004 г., Миккели, Финляндия. СПб., 2004. С. 424–426.
19. Бубенчикова В.Н., Кондратова Ю.А, Гончаров Н.Ф. // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы 7 Междунар. съезда. 3–5 июля 2003 г., Санкт-Петербург– Пушкин. СПб., 2003. С. 515–517

20. П.В. Сергиев<sup>1\*</sup>, И.А. Остерман<sup>1</sup>, А.Я. Головина<sup>1</sup>, И.Г. Лаптев<sup>1</sup>, Ф.И. Плетнев<sup>1</sup>, С.А. Евфратов<sup>1</sup>, Е.И. Марусич<sup>2</sup>, С.В. Леонов<sup>2</sup>, Я.А. Иваненков<sup>2</sup>, А.А. Богданов<sup>1</sup>, О.А. Донцова<sup>1</sup>. ПРИМЕНЕНИЕ РЕПОРТЕРНЫХ ШТАММОВ ДЛЯ СКРИНИНГА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ // Биомедицинская химия, 2016 том 62, вып. 2, с. 117-123.
21. Государственный реестр лекарственных средств. Т. 1. М.: Минздрав России. Фонд фармацевтической информации, 2001. 1277 с.
22. Муравьёва Д.А. Фармакогнозия: учебник. М.: Медицина, 1991. 560с.
23. Н.Ф. Гусев, Ю.А. Докучаева, А.Г. Клунов, Использование *Artemisia absinthium* L. (сем. Asteraceae) степной зоны оренбургского Предуралья в современной фитотерапии. Оренбургский ГАУ, 2010.
24. Махлаюк В.П. Лекарственные растения в народной медицине. - М.: Нива России, 1992. - 478 с.
25. Силина Ю.В. Аптека на огороде. – М.: Эксмо, 2005. – 320 с.
26. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. – М.: Медицина, 1985. – 464 с
27. Гусев Н.Ф. К вопросу о новых перспективных видах лекарственного растительного сырья в южных областях России / Н.Ф. Гусев, О.Н. Немерешина // Известия ОГАУ. - 2008 - № 3(19). - С. 258-261.
28. Блинова К. Ф. и др. Ботанико-фармакогностический словарь: Справ. пособие / Под ред. К. Ф. Блиновой, Г. П. Яковлева. — М.: Высш. шк., 1990. — С. 191.
29. Лекарственные свойства сельскохозяйственных растений / Под ред. к.ф.н. М.И. Борисова. – Мн.: Ураджай, 1974. – 336 с.
30. Аджихметова С.Л. Андреева О.А. Оганесян Э.Т. антиоксидантная активность экстрактов из листьев, плодов и стеблей крыжовника отклоненного (*grossularia reclinata* (l) mill.). Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10 (часть 6) – С. 1297-1301.

31. Сидоренко С. В., Тишков В. И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 263–306.
32. Morrissey JP, Osbourn AE. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63:708–24.
33. Xiaoguang Liang, Bo Li, Fei Wu, Tingzhao Li, Youjie Wang, Qiang Ma, and Shuang Liang. Bitterness and antibacterial activities of constituents from *Evodia rutaecarpa*. 2017; 17: 180.
34. Eugene Ikobi, Cecelia.I.Igwilo , Olufunso Awodele, Chukwuemeka Azubuiké. Antibacterial and Wound Healing Properties of Methanolic extract of dried fresh *Gossypium barbadense* Leaves. 2012
35. Kohanski M.A. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics: M.A. Kohanski, D.J Dwyer, B. Hayete, C.A Lawrence, J.J. Collins (2007). *Cell* 130: 797-810.
36. Kohanski M.A. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death: M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, L. Wierzbowski, G. Cottarel, J.J. Collins (2008). *Cell* 135: 679-690.
37. Kolodkin-Gal I. The stationary-phase sigma factor sigma(S) is responsible for the resistance of *Escherichia coli* stationary-phase cells to mazEF-mediated cell death *J. Bacteriol*: Kolodkin-Gal, I. Engelberg-Kulka, H. (2009). 191: 3177-3182. 22. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review // *Ann.Bot. Lond.* – 2003. – Spec № – P. 179-194.
38. Roemer T., Boone C. // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9. № 4. P. 222–231
39. Glassbrook N., Beecher C., Ryals J. // *Nat. Biotech.* 2000. V. 18. № 11. P. 1142–1143.

40. Kersten R.D., Yang Y.-L., Xu Y., Cimermancic P., Nam S.-J., Fenical W., Fischbach M.A., Moore B.S., Dorrestein P.C. // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 11. P. 794–802.
41. Ibrahim A., Yang L., Johnston C., Liu X., Ma B., Magarvey N.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 47. P. 19196–19201.
42. Kjer J., Debbab A., Aly A.H., Proksch P. // *Nat. Protocols.* 2010. V. 5. № 3. P. 479–490
43. Sukuru S.C.K., Jenkins J.L., Beckwith R.E.J., Scheiber J., Bender A., Mikhailov D., Davies J.W., Glick M. // *J. Biomol. Screening.* 2009. V. 14. № 6. P. 690–699
44. Elbahloul Y., Frey K., Sanders J., Steinbüchel A. Protamylase, a Residual Compound of Industrial Starch Production, Provides a Suitable Medium for Large-Scale Cyanophycin Production. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005; 71(12): 7759–67.
45. Raghunath D. Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India // *J Biosci.* 2008. V. 33(4). P. 593–603.
46. Galli G., Matteoni R., Bianchi E. et al. Replica filter assay of human  $\beta$ -adrenergic receptors expressed in *E. coli*. *Biochemical and biophysical research communications.* 1990; 173(2): 680–8.
47. Songer J.G., Libby S.J., Iandolo J.J., Cuevas W.A. Cloning and Expression of the Phospholipase D Gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity.* 1990; 58(1): 131–6.
48. Rice P.W., Dahlberg J.E. A Gene Between *polA* and *glnA* Retards Growth of *Escherichia coli* When Present in Multiple Copies: Physiological Effects of the Gene for Spot 42 RNA. *Journal of Bacteriology.* 1982; 152(3): 1196–210.
49. Nordström K., Aagaard-Hansen H. Maintenance of bacterial plasmids: Comparison of theoretical calculations and experiments with plasmid R1 in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics.* 1984; 197(1): 1–7

50. Sallinen V., Akl E. A., You J. J. et al. Meta-analysis of antibiotics versus appendicectomy for non-perforated acute appendicitis // *Br J Surg*. 2016. V. 103(6). P. 656-667. doi: 10.1002/bjs.10147

51. [Shallcross L.J., Davies S.C. The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 11: 2883—2885.].



## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Башкирский государственный медицинский  
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ ANTIPLAGIAT.VUZ

Автор работы: Багапова Рида Радимовна  
Самоцитирование  
рассчитано для: Багапова Рида Радимовна  
Название работы: ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТОВ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ  
Тип работы: Выпускная квалификационная работа  
Подразделение:

### РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	24.83%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	24.83%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	63.46%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	74.36%
ЦИТИРОВАНИЯ	11.7%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.81%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 19.06.2021

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 19.06.2021 10:21

Модули поиска: ИПС Адилет; Модуль поиска "БГМУ"; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна  
ФИО проверяющего

Дата подписи: 19.06.2021



Чтобы убедиться  
в подлинности справки, используйте QR-код,  
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование  
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.  
Предоставленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.

## ОТЗЫВ

на \_\_\_\_\_ выпускную квалификационную работу \_\_\_\_\_ студента группы \_\_\_\_\_ Б-401А  
(Форма выпускной квалификационной работы) (Багаповой Риды Радимовны) (Шифр группы)

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Исследование антибактериальных свойств экстрактов бобовых растений

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию  
Полностью соответствует

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).  
Тема работы актуальна так как на сегодняшний день ведется поиск новых антибиотиков.

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач Выпускник проявил отличное умение самостоятельно и творчески решать поставленные задачи, практическая и теоретическая подготовленность на отличном уровне, выпускник готов к выполнению профессиональных задач.

4 Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР.  
при написании работы использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft PowerPoint, владение программ хорошее

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР.

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР) студентов выпускных курсов БГМУ

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости). \_\_\_\_\_  
Работа выполнена в соответствии с требованиями  
(дополнительные сведения представлены на \_\_\_\_\_ листах приложения)

9 Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Автором тема глубоко проработана, и глубоко изучена, заслуживает внимания результаты и обсуждения

10 Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. «Хорошо»

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки хорошо при успешной сдаче  
Руководитель выпускной квалификационной работы

Научный руководитель:

Профессор д.б.н

Баймиев А.Х.

(Фамилия, имя, отчество, должность)



(Подпись)





