

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

Садыков Эльмир Марсельевич

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ НА
ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ**

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии

Ю.Л. Борцова

Уфа - 2021

Оглавление

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1. Культивирование микроорганизмов.....	8
1.2. Изучение процессов свободно-радикального окисления.....	12
1.3.Хемилюминесцентный метод исследования свободно- радикального окисления.....	20
1.4. Изучение процессов окислительного стресса в культивировании микроорганизмов.	24
1.5. Окислительный стресс у бактерий о повреждения молекуляр- ных структур активными формами кислорода.....	27
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	42
3.1. Культивирование микроорганизмов на питательных средах. ..	42
3.2.Изучение процессов хемилюминесценции сред культивирования микроорганизмов.	45
3.3. Влияние исследуемых сред на параметры хемилюминесценции в динамике.	46
3.4. Исследование процессов СРО в средах с культивированным в них микроорганизмом.	48
3.5. Исследование влияния стресс-фактора NaCl на изменения параметров ХЛ (светосумма).....	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	63
ВЫВОДЫ.....	68
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	68
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	77

Список сокращений и условных обозначений

АОА - антиоксидантная активность

АТФ - аденозинтрифосфат

АФК - активные формы кислорода

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

МО - микроорганизм

МПА - мясо-пептонный агар

НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПОЛ - перекисное окисление липидов

СРО – свободно-радикальное окисление

ХЛ - хемилюминесценция

XLD - ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар

ЭКДА - экстракт кормовых дрожжей агаризованный

ВВЕДЕНИЕ

Современная микробиология без питательных сред существовать не может, а их качество во многом определяет информативность и точность микробиологического анализа [13]. Питательные среды по праву можно назвать основой микробиологии. Они используются в диагностике инфекционных заболеваний и при эпидемиологическом контроле за санитарным состоянием окружающей среды, в производстве вакцинных и биологически активных препаратов, при выборе рациональной антибиотикотерапии и контроле за качеством лечения, при определении микробной загрязненности лекарственных препаратов и проведении лабораторных исследований с музейными и свежевыделенными штаммами микроорганизмов. Гарантией получения достоверных результатов микробиологических исследований является использование питательных сред стабильно высокого качества, которое может быть достигнуто при промышленном производстве, где в основе коммерческих разработок лежат научные разработки, где налажен процесс контроля качества, в процессе которого тщательно проверяется качество сырья и конечного продукта [12]. При подборе питательной среды, следует учитывать ее полноценность, то есть обоснованный и сбалансированный набор различных питательных соединений, необходимых микроорганизму для построения растущей клетки. Для нормального роста и развития микроорганизмов в питательной среде должны присутствовать все элементы, из которых формируется клетка [41]. Бактерии нередко оказываются под действием факторов и условий, способных вызвать окисление компонентов клеток. Основными прооксидантами являются ионизирующее излучение и свободные радикалы, которые в аэробных условиях представлены, в основном, активными формами кислорода (АФК). Свободные радикалы участвуют в поддержании гомеостаза аэробных организмов, аккумуляции и биотрансформации энергии, обеспечивают защитные функции, в частности, детоксикацию чужеродных соединений, влияют на иммунитет [46]. Активность возникновения свобод-

ных радикалов находится в прямой зависимости и от состояния окружающей среды [27]. Отсутствие баланса между продукцией активных форм кислорода (АФК) и активностью антиоксидантной защиты живых клеток является одной из главных причин возникновения многих заболеваний на молекулярно-клеточном уровне. Чрезмерное количество АФК в клетке приводит к повреждению ДНК, белков и клеточных мембран и как следствие, повреждению клеток организма [45]. Эти радикалы особенно активно взаимодействуют с мембранными липидами, содержащими ненасыщенные связи, и изменяют свойства клеточных мембран [25]. Перекисное окисление липидов, индикатор окислительного стресса в клетках и тканях, считается довольно хорошо выученным механизмом повреждения [57]. Поскольку процесс перекисного окисления липидов сопровождается хемилюминесценцией (ХЛ), весьма перспективными являются хемилюминесцентные методики, которые характеризуются высокой чувствительностью, простотой и дешевизной [10]. Непрерывный мониторинг активных форм кислорода (АФК) в биологических системах - одна из нерешенных проблем в связи с их высокой реакционной способностью и коротким сроком жизни. Более того, изучение кинетических характеристик АФК является крайне сложным из-за множества взаимосвязанных друг с другом окислительно - восстановительных реакций и низких концентраций АФК, динамично меняющихся с течением времени [39]. Поскольку окислительный стресс является нарушением баланса между системой генерации АФК и системой антиоксидантной защиты, то при его оценке требуется количественное описание обеих составляющих. Для этих целей может быть успешно использован хемилюминесцентный метод анализа [5]. Метод хемилюминесцентного анализа является одним из наиболее информативных методов и позволяет с большой точностью определить интенсивность протекания свободно-радикальных реакций в биологических системах, а также оценить эффективность работы систем антиоксидантной защиты организма и АОА фармакологических веществ [15]. Хемилюминесцентные методы обладают высокой чувствительностью и позволяют проводить кинетиче-

ские измерения [49]. Исследователи имеют крайне ограниченные возможности управления хемилюминесцентными реакциями - практически только смешение реагентов и изменение температуры. Это препятствует созданию новых хемилюминесцентных диагностических систем с заданными свойствами, например, обладающих избирательностью действия. Таким образом разработка новых хемилюминесцентных диагностических систем является актуальной задачей [18].

Цель исследования: Изучить влияние условий культивирования бактерий на хемилюминесценцию.

Задачи исследования.

1. Изучить показатели хемилюминесценции в условиях культивирования микроорганизмов на разных питательных средах.
2. Выяснить, как меняются параметры хемилюминесценции в динамике культивирования микроорганизмов.
3. Изучить влияние стресс-фактора NaCl на параметры хемилюминесценции, как условия культивирования.
4. Охарактеризовать практическое применение хемилюминесцентного метода для оценки условий культивирования и изучения функционально-метаболической активности микроорганизмов.

Научная новизна:

1. Впервые было изучено изменение хемилюминесценции питательных сред в динамике культивирования: проведена оценка действия фактора времени на параметры хемилюминесценции;
2. Впервые была дана оценка на параметры хемилюминесценции различных питательных сред, как условий культивирования, связанных с разным качественно-количественным составом элементов питания;
3. Впервые было изучено действие на параметры хемилюминесценции водного раствора NaCl для создания в среде культивирования микроорганизмов условий окислительного стресса.

План работы:

1. Изучение процессов хемилюминесценции сред культивирования микроорганизмов.
2. Исследование влияния изменения условий культивирования микроорганизмов (разные питательные среды, динамика культивирования, добавление стресс-фактора водного раствора NaCl) на параметры хемилюминесценции.
3. Анализ и оценка полученных данных параметров ХЛ (светосумма).

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Культивирование микроорганизмов

Для культивирования микроорганизмов (выращивание в искусственных условиях *in vitro*) необходимы особые субстраты - питательные среды. На средах микроорганизмы осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.), поэтому их еще называют «средами для культивирования». Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Среда должна создавать оптимальные (наилучшие) условия для жизнедеятельности микроорганизмов. Посев - один из стационарных методов культивирования микроорганизмов на питательных средах, применяемый для культурально-морфологической диагностики в медицинской микробиологии, а также для исследования биохимических и биологических свойств в различных биотехнологических целях. В зависимости от содержания исследуемых бактерий в образце, проводят посев на плотные питательные среды (для получения изолированных колоний и определения чистоты культуры). Если в исследуемом материале содержание микроорганизмов незначительное, то посев проводят на жидкие среды обогащения [2].

Аэробные микроорганизмы можно культивировать (выращивать) на поверхности жидких и плотных сред - поверхностное культивирование или внутри жидкой питательной среды - глубинное культивирование. При поверхностном культивировании кислород поступает в клетки микроорганизмов непосредственно из воздуха, поэтому важно увеличить площадь соприкосновения среды с воздухом. Для этого среды наливают тонким слоем в посуду с широким дном - чашки Петри, колбы Виноградского, матрасы. Посев на плотные питательные среды используют для получения изолированных колоний и определения чистоты культуры. В случае если в исследуемом материале содержание микроорганизмов незначительное, то посев проводят на жидкие среды обогащения. Для увеличения поверхности соприкосновения

питательной среды с кислородом воздуха в глубинном культивировании используют качалки (шейкеры), обеспечивающие встряхивание или вращение колб, пробирок. Чем больше частота вращения, тем больше соприкосновение среды с воздухом и выше насыщение ее кислородом.

Существуют два режима культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде: периодическое и непрерывное (проточное). В случае периодического культивирования после инокуляции среды в нее не добавляют и из нее не удаляют какие-либо компоненты, кроме газовой фазы [2].

В качестве модельного организма удобно использовать прокариот, поскольку они обладают быстрыми темпами роста, а характеристики отдельных штаммов хорошо известны. Кроме того, культуры удобно сохранять в течение длительного времени, и опыты легко воспроизводимы. Именно по этим причинам в данной работе использовался один из наиболее изученных микроорганизмов – кишечная палочка (*Escherichia coli*) [26].

E. coli в настоящее время является наиболее изученным представителем нормальной микрофлоры толстого кишечника человека и животных [7]. *E. coli* (эшерихии) - преимущественные бактерии нормальной факультативно-анаэробной микрофлоры кишечника человека и животных, но ряд сероваров могут быть возбудителями острых инфекционных болезней животных всех видов. Наряду с тем, что эшерихии являются возбудителями инфекционных болезней, эти синантропные бактерии относятся еще и к основным санитарно-показательным микроорганизмам [43].

Эшерихии относятся к типу *Proteobacteria* классу *Gammaproteobacteria* порядку *Enterobacteriales* семейству *Enterobacteriaceae* роду *Escherichia*. Основным видом рода *Escherichia*, имеющим медицинское значение, является *E. coli* (кишечная палочка). Эта бактерия обладает возможностью получать энергию двумя способами: с помощью дыхания и путем ферментации с образованием смеси органических кислот [35].

Эшерихии представляют собой полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными концами средних размеров (длина 2-6 мкм и ширина 0,4-0,6 мкм).

Эшерихии являются аэробами или факультативными анаэробами. Оптимальная температура роста 35-37°C. Хорошо растут на простых питательных средах. На МПА эшерихии образуют колонии средних размеров, серо-белые, гладкие, влажные, блестящие, с ровными краями (S-форма). В жидких средах вызывают равномерное помутнение, иногда образуют незначительный осадок.

Характерным признаком эшерихий является ферментация лактозы. По способности ферментировать лактозу различают лактозоположительные и лактозоотрицательные кишечные палочки. В качестве дифференциально-диагностических сред при выделении кишечной палочки используют среды, содержащие лактозу (среды Эндо, Левина, Плоскирева).

Среда Эндо содержит МПА, лактозу, фуксин и натрия сульфит. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет. Сульфит натрия и фуксин оказывают ингибирующее действие на большинство грамположительных микроорганизмов. При разложении эшерихиями лактозы pH смещается в кислую сторону в результате образования ацетилальдегида, который взаимодействует с сульфитом натрия и приводит к восстановлению фуксина. Лактозоположительные штаммы кишечной палочки на среде Эндо образуют темно-красные колонии с металлическим блеском.

Среда Плоскирева содержит агар, лактозу, желчные кислоты, йод, нейтральный красный, бриллиантовый зеленый, соли. Готовая среда имеет светло-коричневый цвет. Желчные кислоты, йод, бриллиантовый зеленый подавляют рост грамположительных бактерий. На среде Плоскирева лактозоположительные штаммы кишечной палочки образуют колонии брусничного цвета.

Среда Левина (ЭМС-агар) содержит МПА, лактозу, эозин и метиленовый синий. Готовая среда имеет красновато-фиолетовый цвет. На среде

Левина лактозо-положительные штаммы кишечной палочки образуют темно-фиолетовые (черные) колонии с зеленоватым оттенком [27].

1.2. Изучение процессов свободно-радикального окисления

Воздействие различных внешних факторов физической, химической и биологической природы, а также внутренние процессы существования человеческого организма приводят к тому, что в организме начинают накапливаться свободные радикалы [11]. Свободные радикалы, образующиеся в организме, нарушают структуру мембран клеток, что, в свою очередь, ведет к развитию различных патологических состояний [9]. Гибель клетки происходит в результате некроза либо апоптоза. Механизмы некроза клетки достаточно изучены в отличие от апоптоза, в индукции которого важная роль принадлежит оксидативному стрессу, когда образуется избыточное количество свободных радикалов [29].

Свободные радикалы представляют собой короткоживущие химически активные химические промежуточные соединения, которые содержат один или несколько неспаренных электронов [32]. Атомы многих двухвалентных молекул являются свободными радикалами, например, H, N, O. Свободные радикалы имеют повышенную химическую активность [38]. Учитывая, что процессы образования активных форм кислорода и азота играют двойственную роль в организме, представляется более корректным использовать термин «окислительный стресс» для обозначения дисбаланса между продукцией оксидантов, инициирующих процессы свободнорадикального окисления, и активностью системы антиоксидантной защиты организма, нейтрализующей эти процессы [55].

Окислительный стресс (превышение продукции активных форм кислорода и азота над их инактивацией антиоксидантами) является важным патогенетическим фактором, вызывающим развитие сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, воспалительных и инфекционных патологий, злокачественных новообразований [17]. Основным «инструментом» или движущей силой окислительного стресса служат активные формы кислорода [4]. В норме уровень АФК и антиоксидантная активность (оксидантно-антиоксидантный статус) находятся в состоянии баланса, но при опреде-

ленных условиях может возникнуть его нарушение в пользу активных форм [40]. Высокие концентрации АФК в клетке - признак оксидативного стресса и причина гибели клеток [20]. Свободнорадикальное окисление (СРО) липидов является необходимым метаболическим процессом, обеспечивающим гомеостаз для целостного организма, который зависит от состояния антиоксидантной системы [44]. Интенсивность свободно-радикального окисления (СРО) при патологических процессах обусловлена взаимодействием разнонаправленных групп факторов. Один - это прооксиданты, катализирующие ПОЛ; другой - антиоксидантный каскад, являющийся противовесом свободнорадикальных процессов и поддерживающий их на стабильном физиологическом уровне [21].

В биологических объектах различают природные и чужеродные радикалы. Известно, что чужеродные радикалы на основе кислорода образуются в результате физического или химического воздействия на клетки живых организмов. Радикалы повреждают аминокислоты и белки, дезорганизуют клеточные структуры и биологические мембраны. Доказана роль чужеродных свободных радикалов в развитии таких болезней, как рак, атеросклероз, инфаркт миокарда, инсульт, ишемия; заболеваний нервной и иммунной систем, легких, печени, почек, крови, кожи; также они вызывают преждевременное старение. Для снижения агрессивного влияния радикалов на организм человека и животных в биологических объектах имеются специализированные ферментные системы, а также природные биоорганические соединения и синтетические соединения антиоксидантной защиты для нейтрализации радикалов. Роль антиоксидантной защиты выполняют биокатализаторы: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионзависимая пероксидаза, трансфераза, которые понижают негативное воздействие радикалов путем удаления перекисных соединений.

Механизм антиоксидантной защиты сводится к их взаимодействию со свободными радикалами и превращению последних в неактивные молекулы, обеспечивая таким образом обрыв цепи свободнорадикального окисления. В

отличие от чужеродных радикалов, в живых системах преобладают природные радикалы, которые образуются в результате ферментативных реакций и выполняют ключевую роль в процессах жизнедеятельности клеток: в реакциях биосинтеза, окислительного фосфорилирования, регуляции липидного обмена, процессах митоза, метаболизма и др. Ежедневно каждая клетка генерирует миллионы соединений, обладающих естественной радикальной природой, которые участвуют в жизненно важных одноэлектронных биохимических процессах, связанных с отдачей или приобретением электронов. Существенную роль в радикальных окислительно-восстановительных реакциях клетки выполняют коферменты NAD, NADP, FAD, FMN, CoQ и др., которые являются акцепторами электронов для одной группы ферментов в полиферментном комплексе и донорами для другой. Коферменты способны образовывать промежуточные радикальные структуры и комплексы с переносом заряда в биологических мембранах, обеспечивая перенос энергии и транспорт электронов. При этом восстановление и окисление метаболитов сопровождается циклической ферментативной регенерацией коферментов [56].

Известно, что свободные кислородные радикалы образуются во всех аэробных организмах вовремя как физиологических, так и патологических процессов [47]. В организме человека происходит, с одной стороны, постоянная генерация свободных радикалов, с другой - осуществляется действие антиоксидантов.

При нормальных, физиологических условиях в тканях медленно, непрерывно протекают процессы свободно-радикального окисления с образованием активных продуктов - свободных радикалов, реактивных альдегидов и кетонов. В физиологических концентрациях эти метаболиты обуславливают ряд приспособительных реакций, в числе которых:

1. Обновление липидов биологических мембран, модификация их функций.

2. Фагоцитоз: макрофаги содержат фермент НАДФН-оксидазу, который генерирует свободные радикалы, осуществляющие окислительную деградацию антигенов белковой природы.

3. Активация ферментных систем тканевого дыхания;

4. Повышение устойчивости организма к гипоксии.

5. Нейтрализация повреждающего действия избытка катехоламинов.

В ряде случаев процессы свободно-радикального окисления могут резко усиливаться и приобретать разрушающее действие, проявляющееся:

1. Флюидизацией (увеличение жидкости) гидрофобной области липидного бислоя мембран;

2. Появлением в гидрофобном хвосте жирной кислоты гидрофильной группы;

3. Распадом веществ с антиоксидантной активностью;

4. Образованием трансмембранных перекисных кластеров;

5. Изменением функциональных свойств мембранных белков;

6. Трансформацией активности ряда мембрано-связанных ферментов и рецепторов.

Для поддержания нормального уровня свободно-радикального окисления существуют антиокислительные механизмы. Биохимическую антиоксидантную систему можно разделить на неспецифическую и специфическую. Действие первой связано с предотвращением условий и возможностей утечки электронов из дыхательной цепи митохондрий и генерации активных форм кислорода (АФК). Специфическая же направлена на разрушение АФК и продуктов их превращений и представлена ферментными (супероксиддисмутаза [СОД], каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза) и неферментными (аскорбатная окислительно-восстановительная система, тиолсульфидная система на основе глутатиона, ароматические соединения, витамины Е, Р, флавоноиды, полифенолы, в том числе убихинон) специализированными системами.

При патологических состояниях баланс между процессами свободно-радикального окисления и антиоксидантной защиты нарушается: увеличивается концентрация прооксидантов, к которым, в первую очередь, относят АФК (супероксиданион, синглетный кислород, гидроксильный и алкоксильный радикалы). Возникает состояние «окислительного, или оксидативного стресса» [31].

Свободные радикалы реагируют со всеми биологическими молекулами, которые встречаются им на пути:

Повреждение белка. В результате чего происходит резкое старение клетки. Это хорошо видно по внешности. Кожа становится сухой, дряблой. Мышцы ослабевают, утрачивая тонус. Стареев целый организм, поскольку стареют все клетки, в которых белок атакован свободными радикалами.

Повреждение ДНК – генетический код клетки, что в свою очередь приводит к изменениям в структуре его кода, его свойств и даже мутации. Со временем такие клетки образуют раковую опухоль.

Влияние на процесс развития болезней кровообращения. Наука доказала, что именно они и повинны в развитии атеросклероза, инфаркт, инсульт, ишемия, атеросклероз, заболевания нервной и иммунной систем и заболевания кожи.

Причины образования свободных радикалов.

Раньше других был установлен путь их образования под действием радиационного облучения.

Широко обсуждается и влияние курения: никотин и смолы поражают клетки организма, запуская целый ряд свободно радикальных реакций.

Самыми распространенными на сегодня причинами образования свободных радикалов считаются плохая экология, автомобильные выхлопные газы.

Ультрафиолетовое излучение. В результате окисления молекулы превращаются в радикалы, что вызывает фотостарение.

Доказано и мощное влияние стресса на активацию свободно радикальных процессов. Гормоны стресса, адреналин и кортизол, при неблагоприятных жизненных ситуациях вырабатываются в повышенных количествах, нарушая питание и нормальное дыхание клетки, что моментально приводит к накоплению и распространению радикалов во всем организме. Старение и физиологическое изнашивание организма - главные последствия свободно радикальных реакций [42].

Активные формы кислорода (АФК) - это молекулы органического или неорганического происхождения, имеющие неспаренный электрон на внешнем электронном уровне. В большей степени к ним относятся ионы кислорода, свободные радикалы и различные перекисные соединения. Образование АФК в клетках бактерий происходит в аэробных условиях на клеточной мембране и связано это с деятельностью цепи дыхательных ферментов. Утечка электронов из электронно-транспортной цепи в процессе окислительного фосфорилирования и непосредственное их взаимодействие с кислородом - основной путь образования активных форм кислорода в большинстве клеток. Тем не менее, образование продуктов неполного восстановления кислорода считается нормальным процессом. Активные формы кислорода и радикалы, синтезируемые в организме, выполняют как вредные, так и полезные для клетки функции. Высокая концентрация свободных радикалов в клетке может привести к окислительному стрессу, вызывающему повреждение различных структур: ДНК, белков и липидов. У бактерий могут образовываться гидроксильные радикалы, которые в дальнейшем окажут повреждающее действие. Гидроксильные радикалы, воздействуя на гистидиновые группы и аминокислотные составляющие белков, вызывают их разрушение, и повреждают ферменты. Мутацией и гибелью бактерий может произойти из-за разрыва нуклеиновых кислот и углеводных мостиков. Негативное воздействие АФК на клетку может привести к клеточной смерти. Вследствие высокой токсичности АФК произошло существенное сокращение биоразнообразия первичной анаэробной микро-биоты. Однако большинство видов бактерий

выработало средство защиты от губительного действия активных форм кислорода - антиоксидантные системы [30].

В нормально функционирующей дыхательной цепи митохондрий генерируются активные формы кислорода (АФК), их источником являются ферментативные реакции, представляющие собой хорошо регулируемый процесс [53]. В норме в ходе клеточного метаболизма образуются активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА), которые являются не только побочными продуктами химических реакций, но и участвуют в различных клеточных процессах: защита от патогенных микроорганизмов (H_2O_2 , $HOCl$, $ONOO^-$, OH^-), оплодотворение (H_2O_2), деление клеток апоптоз (H_2O_2), регенерация (H_2O_2), координация направления клеточного движения (H_2O_2), регуляция тонуса сосудов (NO^-) и т.д. Однако чрезмерно продуцируемые АФК и АФА - молекулы с высокой реакционной способностью, которые могут приводить к различным повреждениям клеток [58].

В живых системах существуют два основных типа использования кислорода клеткой (два пути окисления): оксидазный и оксигеназный. В первом случае в результате последовательных реакций ферментативного дегидрирования углеводов и жиров и последующего транспорта электронов в митохондриях на конечном пункте этого транспорта - в ферменте цитохромоксидазе - происходит 4-электронное восстановление кислорода с образованием воды. Таким образом, в клетке синтезируется АТФ, а также вода и углекислота. Оксидазный путь не предусматривает включения кислорода в молекулу окисляемого субстрата. Наряду с этим в клетках протекают реакции прямого присоединения кислорода к органическим веществам (оксигеназный путь). В оксигеназных реакциях полного 4-электронного восстановления кислорода не происходит, а наблюдается в основном неполное одноэлектронное его восстановление. Появление неспаренного электрона в молекуле кислорода придает ей свойства свободного (активного) радикала.

Окислительному стрессу подвержены все организмы с аэробным дыханием, поскольку активные формы кислорода (АФК) образуются вследствие

нормального метаболизма. Большинство АФК, такие как пероксид водорода, супер-оксидный и гидроксильный радикалы, являются побочными продуктами в электронно-транспортной цепи в процессе окислительного фосфорилирования. В метаболических путях у *E. coli* встречается два пути расщепления перекиси водорода - с образованием кислорода и воды; окисление L-аскорбата до L-дегидроаскорбата. Помимо участия в метаболических путях, перекись водорода участвует в реакциях окисления и реакциях-Фентона, происходящих в клетках *E. coli*. Развитие окислительного стресса в бактериях вовлекает в работу два ключевых регулона, контролируемые транскрипционными активаторами *soxR* и *oxyR*. Белки, экспрессия которых индуцируется системой *SoxRS*, действуют совместно и устраняют возможный ущерб от окислительного стресса, используя механизмы удаления оксидантов (супероксид дисмутаза), репарацию ДНК (эндонуклеаза IV), восстановление окисленных металлов в простетических группах (флаводоксин и ферредоксин редуктаза) и системы НАДФН (глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа), снижение проницаемости (*micF*) и экскрецию токсинов (порины). Активация генов регулона *SoxRS* увеличивает устойчивость клетки не только к супероксид генерирующим агентам, но и к органическим растворителям, а также оксиду азота (NO), который может генерироваться антибиотиками [24].

Скорость продукции активных форм кислорода (АФК) не является постоянной, определяется количеством редокс-активных сайтов и зависит от условий культивирования.

АФК способны повреждать все виды макромолекул в клетке, включая ДНК, липиды и белки, и нарушать метаболизм клетки путем инактивации ферментов, содержащих железо.

Для борьбы с этими окислительными повреждениями клетки *E. coli* используют ряд ферментативных защитных систем, включая супероксиддисмутазы (MnSOD, FeSOD и CuZnSOD), каталазы (HPI и HPII) и алкилгидропероксидредуктазу (AhpFC). Активность антиоксидантных систем регулируется таким образом, чтобы снизить концентрацию АФК до безопасного уровня.

Различные стрессы у бактерий часто сопровождаются торможением дыхания, что может приводить к повышению скорости образования АФК. При этом степень индукции антиоксидантных ферментов может играть важную роль для процесса адаптации к новым условиям окружающей среды [36].

1.3. Хемилюминесцентный метод исследования свободно-радикального окисления

Методы определения концентрации свободных радикалов можно разделить на прямые и косвенные. Прямые методы - электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) и, с некоторыми оговорками, хемилюминесценция (ХЛ). Косвенные методы - определение продуктов реакций, протекавших с участием свободных радикалов, и ингибиторный анализ. Прямое определение концентрации свободных радикалов в клетках и тканях, в растворах и суспензиях клеточных органелл осложняется их высокой реакционной способностью и малым временем жизни, в результате их концентрация в исследуемых объектах очень низка и отличается от концентрации в живом организме. Решить часть проблемы, связанную с коротким временем жизни свободных радикалов, позволило использование спиновых ловушек - молекул, которые при взаимодействии с нестабильными радикалами образуют стабильные нитроксильные радикалы (спиновые аддукты), сигналы ЭПР которых затем измеряют с целью качественного и количественного определения концентрации соответствующих радикалов. Аналогичная ситуация сложилась и с применением ХЛ. Реакции рекомбинации супероксид-, гидроксил- и липидных радикалов и оксида азота сопровождаются очень слабой собственной или неактивированной ХЛ. Изучение этой ХЛ внесло большой вклад в исследование процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, однако существенным недостатком этого метода является низкая интенсивность сигнала. В связи с этим получили широкое применение так называемые активаторы хемилюминесценции: - химические, вступающие с определенными радикалами в реакции, сопровождающиеся свечением: люцигенин, дающий свечение с супероксид-радикалами, и люминол, дающий мощное

свечение в присутствии гидроксил-радикалов; - физические (сенситизаторы), не вступающие в реакцию с радикалами. [54].

На сегодняшний день ХЛ представляет большую область науки, находящуюся на стыке между химией, физикой и биологией. Хемилюминесценция - это люминесценция (свечение) тел, вызванная химическим воздействием или протеканием химической реакции. В ходе реакции хемилюминесценции получают возбужденные продукты, которые затем отдают избыток энергии, излучая свет, т. е. химическая энергия, превращается в энергию электромагнитного излучения. Хемилюминесценция всегда привлекала повышенное внимание исследователей. Этот интерес обусловлен как чисто фундаментальными аспектами, так и возможностями разнообразных практических приложений. Действительно, био- и хемилюминесценция широко используются в различных аналитических целях в промышленности, биологии, медицине и т.д. Используя явление хемилюминесценции, можно узнать о том, как протекает реакция, каков ее механизм, что необходимо для эффективного и рационального проведения технологических процессов. Если технологический процесс получения какого-либо химического продукта сопровождается хемилюминесценцией, то ее интенсивность может служить мерой скорости процесса: чем быстрее идет реакция, тем ярче свечение [3]. Метод отличается высокой избирательностью при низком количестве анализируемого образца. С его помощью можно обнаружить наличие свободно-радикальной патологии, проанализировать интенсивность процессов ПОЛ, эффективность лечения антиоксидантными препаратами. Измерение показателей хемилюминесценции (ХЛ) не требует подготовки пробы, в результате которой количество свободных радикалов может измениться [6].

Хемилюминесценция-излучение света, сопровождающее реакции с участием свободных радикалов [22]. ХЛ, основанная на окислении люминола (LH2) (5-амино-2,3-дигидро-1,4фталазиндиона), является одной из наиболее широко изученных и наиболее известных систем ХЛ. Окисление обычно проводят в щелочном растворе с использованием окислителя, такого как пе-

роксид водорода, гипохлорит, перманганат йод. Известно, что система люминола- H_2O_2 является одной из наиболее эффективных систем ХЛ. Люминол-ХЛ в воде в основном применяется для аналитических целей, особенно для судебной медицины (для определения следовых количеств крови) [19].

Хемилюминесценция биологических объектов обычно представляет собой излучение света от электронно-возбуждённых состояний (ЭВС), возникающих в процессе химических реакций свободно-радикального окисления. Электронно-возбуждённое состояние - это такое состояние атома, при котором электрон находится не на своей типичной орбите, а на более высоких энергетических уровнях. При возвращении «падении» электрона с более высоких энергетических уровней на своё законное место на свой «родной» энергетический уровень выделяется квант света. Энергия этого кванта от которой зависит его частота и длина волны равна разности между этими энергетическими уровнями [16].

В современных медико-биологических исследованиях для оценки свободно-радикальной активности различных материалов широко применяются методики с использованием биологических объектов. Самый распространенный метод основан на измерении собственной хемилюминесценции различных биологических субстратов. Другой метод основан на применении люминесцентного бактериального теста. В ходе эксперимента фиксируют изменение интенсивности биолюминесценции генно-инженерного штамма при воздействии токсичных веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем [48].

Люминесценцию разделяют на множество видов, где каждое название обычно подразумевает физический процесс за счет которого появляется лучеиспускание:

Фотолюминесценция - свечение от воздействия света. Здесь различают два случая - первый, когда свечение продолжается после облучения в течение более длительного периода времени - это фосфоресценция и второй, когда свечение наблюдается лишь в процессе освещения флуоресценция. Стоит

отметить что иногда слово фотолюминесценция заменяют на выражение квантовая люминесценция, так как фотон это и есть квант света. В зависимости от способа возбуждения, где носителями являются частицы, обладающие зарядом, люминесценция подразделяется на электронную или ионную.

ХЛ - свечение, как результат химических процессов. Примером могут служить так называемые светящиеся палочки, состоящие из прозрачного корпуса внутри которого содержится ампула, при разрушении которой вещества смешиваются друг с другом и могут светиться порядка нескольких часов.

Биолюминесценция - способность живых организмов испускать свет. Биолюминесценция рассматривается как отдельный вид люминесценции, но является разновидностью хемилюминесценции, так как основывается на химических процессах. Простым примером животных использующих биолюминесценцию являются обыкновенные светлячки или медузы [23].

1.4. Изучение процессов окислительного стресса в культивировании микроорганизмов

Известно, что при изменении (ухудшении) условий культивирования, например при исчерпании питательных веществ, а также источников энергии или при воздействии неблагоприятных факторов, таких как активные формы кислорода (АФК) и т.п., у микроорганизмов активируется ряд защитных механизмов для обеспечения адаптации в пределах нормы реакции вида или для его выживания в виде покоящихся форм в не ростовых условиях.

При действии повышенных доз АФК на микроорганизмы возникает стресс, характеризующийся как окислительный, а сами стресс-факторы называются агентами окислительного стресса. Долгое время считалось, что стресс неблагоприятно воздействует на микроорганизмы, снижая их физиологическую активность и, как следствие, эффективность биосинтеза. Однако в настоящее время стрессовое воздействие широко используется для повышения эффективности процессов культивирования, поскольку при определенных условиях при воздействии стрессовых факторов возможно улучшение отдельных показателей биосинтеза. Кроме того, микроорганизмы, являющиеся устойчивыми к воздействию одних стрессовых факторов, не снижая при этом физиологической активности. Стрессовые факторы инициируют возникновение в ДНК повреждений. Исследование влияния оксидативного стресса на физиолого-биохимические характеристики культур бактерий выглядит весьма перспективным для подбора условий культивирования МО [8].

Одним из подходов к оценке вклада АФК в антибактериальное действие является сравнение выживаемости клеток при воздействии какого-либо фактора в условиях, приводящих к снижению/усилению внутриклеточной продукции АФК, и контрольных условиях. Развитие вторичного окислительного стресса в условиях воздействия высоких концентраций NaCl, короткоцепочечных жирных кислот и высокой температуры важно с точки зрения пищевой микробиологии, одним из направлений которой является поиск до-

полнительных факторов, способных усиливать антибактериальное действие основных способов обработки пищевых продуктов.

Исследований, посвященных вкладу АФК в гибель клеток под действием естественных стрессовых факторов, не так много, но на их основе можно предположить участие АФК в антибактериальном действии осмотического, кислотного и теплового стрессов [1].

1.5. Окислительный стресс у бактерий о повреждения молекулярных структур активными формами кислорода

Аэробные организмы используют молекулярный кислород (O_2) для дыхания или окисление питательных веществ для получения энергии. Реактиве побочные продукты кислорода, таких как супероксидный анион-радикал (O_2^-), водород-пероксид (H_2O_2), и высоко реактивные гидроксильныерадикалы($\cdot OH$), непрерывно генерируются в клетках. Большинство таких продуктов молекулярного кислорода, катализируемые мембраносвязанные ферменты дыхательной цепи. Экспериментальные данные указывают на то, что при *E. coli* дыхательная цепь можетприходится целых 87% от общей H_2O_2 производства. Утечка одиночных электронов из бактериальной дыхательной цепи наблюдалась на дегидрогеназе N ADH и убихинона, и был похож на то, что наблюдалось у эукариот митохондрии. Экологические агенты, такие как ионизирующие, вблизи-УФ-излучение или многочисленные соединения, которые генерируют внутри-сотовый O_2^- (окислительно-восстановительные агенты) может вызвать окислительный стресс, который возникает приконцентрация активного кислорода возрастает до уровня, превышающего оборонноспособность ячейки . Некоторые иммунные клетки, которые используют фермент НАДФ-оксидаза при инвазии патогенными бактериями, также используют окислительный стресс в качестве оружия во время фагоцитоза. Биологические мишени для этих высокореактивных кислород виды-это ДНКА, РНК, белки и липиды. Большая часть повреждение вызвано гидроксильными радикалами, образующимися из H_2O_2 через реакцию Фентона, которая требует железа (или другого двухвалентногоион металла, такой как медь) и источник восстановительных эквивалентов.(возможно, NADH) для регенерации металла. Липиды являются основными мишени при окислительном стрессе. Свободные радикалы могут атаковать напрямую полиненасыщенные жирные кислоты в мембранах и инициируют образование липидов-перекисное окисление. Первичным эффектом перекисного окисления липидов является снижение текучести мембраны, которая изменяет свойства мем-

браны и может значительно разрушать мембраносвязанные белки. Этот эффект действует как усилитель, образуется больше радикалов, и полиненасыщенные жирные кислоты расщепляются до множества продуктов. Некоторые из них, такие как альдегиды, очень реакционноспособны и могут повреждать молекулы, такие как белки. В отличие от свободных радикалов, альдегиды довольно долго живут и поэтому могут отличия взрывателей от места их происхождения и досягаемости и атаки целей которые далеки от исходного свободно-радикального агента, действуя как “вторые токсичные посланники” сложных цепных реакций инициированных. Среди множества различных альдегидов, которые могут образовываться при перекисном окислении липидов наиболее интенсивно изучаются малоновый альдегид (MDA) и 4-гидроксиалкены, в частности 4-гидроксиноненал (HNE). DNA также является основной мишенью; активные виды атакуют как базовые так и сахарные фрагменты образование одно- и двухнитевых разрывов в позвоночнике, аддукты основных и сахарных групп, а также поперечные связи с другими молекулами, поражений, блокирующих репликацию. Спектр аддуктов в окисленном DNA *in vitro* и *in vivo* включает в себя больше более 20 известных продуктов, включая повреждение всех четырех оснований и тимин-тирозиновые перекрестные связи. Окисление белков, который традиционно был менее хорошо охарактеризован. Несколько классов повреждений документировано, в том числе окисление сульфгидрильных групп, восстановление дисульфидов, окислительная аддукция аминокислот остатки, близкие к местам связывания металлов с помощью металл-катализируемого окисления, реакция с альдегидами, модификация группы или металлические кластеры, сшивка белок-белок и пептидная фрагментация. Все эти модификации вредны клетке, так как они приводят к потере функции мембран белки, и блокируют репликацию ДНК или вызывают мутации. Оборонные механизмы появления кислорода в атмосфере привело к развитию защитных механизмов, которые либо удерживали концентрация O₂-дери введенные радикалы при приемлемых значениях или восстановлены окислительные повреждения. Же-

лезо играет значительную роль в биологии (транспортировка, хранение и активация крота-клеточный кислород, восстановление рибонуклеотидов, активация и разложение пероксидов и перенос электронов) и Fe^{2+} -необходим для роста почти всех клеток. Благодаря своему потенциальным повреждающим эффектам у бактерий-соллюбилизация железа и его разрушение метаболизм строго регулируется на двух уровнях: к клетке специфическими мембрано-связанными рецепторами, и внутри клетки, с помощью двух белков, бактериоферритина и ферритина, похож на эукариотический ферритин, но представляет собой феррооксидазу. Некоторые молекулы присутствуют и помогают поддерживать внутриклеточное снижение или очищать химически активированный кислород. Среди этих молекул есть неферментативные антиоксиданты, такие как пулы NADPH и NADH, β -каротин, аскорбиновая кислота, α -токоферол и глутатион (GSH). GSH, присутствующий в высоких концентрациях, поддерживает сильное снижение окружающей среда в клетке, и ее восстановленная форма поддерживается глутатионредуктазой с использованием НАДФ в качестве кислого редуцирующего агента. Кроме того, специфические ферменты снижают устойчивость. Супероксиддисмутаза (СОД), которая содержит O_2^- к H_2O_2 и O_2 , были описаны в *Escherichia coli*: железосодержащий фермент, экспрессия которого модулируется внутриклеточным железом и марганцем-содержащая СОД, преобладающий фермент при аэробной среде, выражение которого транскрипционно регулируется не менее шести систем управления. Третья активность ДЕРНА свойства, подобные эукариотическому CuZn-SOD, были обнаружены у *E. coli* периплазматическое пространство кишечной палочки. В Кишечной палочке, H_2O_2 исправляется на две каталазы (выходящие H_2O и O_2): гидропероксидаза I (HPI), которая присутствует во время аэробного уровня и транскрипционно контролируется, а также гидропероксидазу II (HPII), которая индуцируется в стационарной фазе. Глутатионпероксидаза и DT-диафораза также являются пугающими ферментами. Вторичная защита включает в себя системы ремонта DNA-протеолитические и липолитические ферменты. DNA ремонтные ферменты

включают эндонуклеазу IV, которая индуцируется окислительным стрессом и оксонуклеазой III, которая индуцируется в стационарной фазе и в голодающих клетках. Оба фермента действуют на дуплекс DNA очистка DNA 3' окончание. Прокариотические клетки содержат катализаторы способные непосредственно восстанавливать некоторые ковалентные соединения модификации первичной структуры белков. Один из наиболее частыми модификациями является восстановление окисленных дисульфидные связи: тиоредоксинредуктаза переносит электроны от N-АДФГ к тиоредоксину через носитель флавина, глутаредоксин также способен восстанавливать дисульфидные связи, но с помощью GSH в качестве донора электронов и белковая дисульфидизомераза облегчает реакции дисульфидного обмена с белковые субстраты, кроме того, обладают активностью. Окисление превращение метионина в метионинсульфоксид может быть восстановлено путем метионинсульфоксид редуктаза. Последние экспериментальные данные описал, что обнаженные на поверхности остатки метионина окружают вход в активную зону предпочтительно окисляется без посторонней помощи потеря каталитической активности и предположение о том, что остатки метионина может функционировать как система антиоксидантной защиты “последнего шанса” для белков. Генетические реакции на окислительный стресс возникают у бактерий, дрожжи, клетки млекопитающих линий и вообще у всех аэробных организмов. Клетки кишечной палочки обладают специфической защитой от пероксидов, опосредованной транскрипционный активатор и еще один против супероксида, управляется двухступенчатой системой soxRS. Соксрс регулон содержит по меньшей мере десять генов, включая те, которые кодируют Mn-код-СОД, эндонуклеаза IV, глюкозо-6-Р ДГ, α-фумараза, аконитаза, ферредоксинредуктаза и *micF* RNA, которые влияют на экспрессия основного белка внешней мембраны. Ген контролирует, среди прочего, гены, кодирующие каталазу HPI, глутаредоксин, глутатионредуктаза, НАДФН-зависимый алкилгидропероксидредуктаза и протективный ДНК-связывающий белок. Активность этих реакций значительно возрастает кле-

точная устойчивость к окислительным агентам. И OxyR, и SoxR присутствуют, но неактивны в организме “безударные” клетки. Было предложено чтобы деятельность SoxR белок может быть получен в результате обратимого одно-электронного окисления его железо-сернистых центров. Совсем недавно сообщалось, что верно активируется образование внутримолекулярная дисульфидная связь, возникающая в результате измененного окислительно-восстановительного процесса состояние цитозоля. Оксидриактивация контролируется клеточными клетками дисульфид-редуцирующими машинами, особенно зависимые от глутаредоксин. Ген, кодирующий глутаредоксин, регулируется оксидом, обеспечивая тем самым механизм ауторегуляции. Использование образования и восстановления дисульфидной связи в качестве переключатель” вкл-выкл для быстрого реагирования на окислительные условия. Ответ против H₂O₂ не заканчивается с активацией из OxyR. OxyR дефектные мутанты способны индуцировать вокруг 20-30 белков в ответ на H₂O₂ Эти мутанты, хоувер, гиперчувствительны к H₂O₂ и даже с более высокой частотой мутаций во время базального метаболизма. Все это наводило на мысль о наличии других неизвестных регуляторных систем. Мутации в OxyR или rob, известные регуляторы в *E. coli*, не оказали влияния на индукцию паракватом. Отметим, что величина H₂O₂ ответа не зависит только по величине и типу стимула, но и фаза роста, реакция максимальна в логарифмической фазе и почти незначительно во время ранней стационарной фазы. Стационарные фазовые культуры *Bacillus subtilis* проявляют полную жизнеспособность после обработки 10 mM H₂O₂, концентрация, которая уменьшает жизнеспособность экспоненциальных фазовых клеток примерно до 0,01%. Такое же явление наблюдалось и в *E. coli*, где ответ был частично охарактеризован и оказался вполне удовлетворительным отдельно от того, что происходит во время экспоненциальной фазы. Было высказано предположение, что голодающие клетки могут подготовиться заранее для возможности воздействия на окружающую среду, так как их способность быстрого реагирования явно скомпromетировано. Это широко распространенное явление, которое наблюдается

у прокариот, дрожжей, млекопитающих и растений. Среди прокариотов, кишечная палочка и сальмонелла *Typhimurium* являются способными адаптироваться к H_2O_2 точно так же. Через 60 мин обработка 60 мкМ H_2O_2 , *S. typhimurium* стал устойчивым к убийству на 10 мМ H_2O_2 (80% жизнеспособности) по сравнению с необработанными клетками (жизнеспособность 1%). *S. typhimurium* стал устойчивым также к другим видам стрессов, таким как тепло, N-этилмалеимид, 1-хлор-2,4-динитробензол и менадион после предварительной обработки с нелетальными уровнями H_2O_2 . Основное физиологическое преимущество адаптивная реакция понятна: для защиты клеток и организмов от больших доз отравляющего вещества. Такая защитная реакция также указывает на то, что клетка, однажды подвергшаяся воздействию токсина, ожидает, или, по крайней мере, готова к последующей смертельной дозе. Окисление белка, начаты исследования свободно-радикального окисления белков в начале 20 века, когда Дейкин сообщил окисление аминокислот системами Фентона в 1906 г.; в 1925 г., Хопкинс описал роль глутатиона как анти- и прооксидант, эта последняя активность зависит от наличия ионов переходных металлов. На клеточном уровне, когда белки подвергаются воздействию реагирующих форм кислорода, модификации аминокислотных возникают кислотные боковые цепи и, следовательно, структура белка изменяется. Эти модификации приводят к функциональным изменениям, которые нарушают клеточный метаболизм. Наблюдаемое накопление и повреждающее действие окисленных белков при общей патологии такие состояния, как нейродегенеративные заболевания, диабет и другие атеросклероз, а также во время старения сильно увеличили исследования в этой области в последние десятилетия 20 века. Цитозольные белки эволюционируют для поддержания своих цистеинов редуцируются в нативной форме, тогда как многие секретруемые белки могут быть более стабильными, когда они соединены в дисульфидных связях. Таким образом, изменения в восстановительной среде цитозоля может оказывать глубокое влияние на сворачивание белков и активность. Хотя это не было прямо продемонстрировано, это кажется вероят-

ным, что неиспользованные дисульфидные связи генерируются в нормальные резидентные белки цитозоля при окислении возникает стресс, эта ситуация, называется “дисульфидный стресс”. Это реверсивный механизм окисления, потому что реакция бактериальных клеток может восстановить окислительно-восстановительный гомеостаз цитозоля и устранить вредный окислитель активацией факторов транскрипции SoxRS и OxiR. Необратимое окисление аминокислотных остатков в белке может быть вызвано двумя основными механизмами: ионизирующим излучением и реакциями окисления, катализируемые ионами металлов. Последствия ионизирующего излучения на белки относят к гидроксильным радикалам, образующиеся при радиолизе воды; этот радикал вступает в реакцию с помощью α -атома водорода аминокислотного остатка образуется углерод-центрированный радикал. В присутствии кислорода образуется сильный радикал, который приводит к расщеплению пептидной связи. Предполагается, что это расщепление происходит либо с помощью диамида, либо с помощью пути α -амидирования. Если кислород отсутствует, то углерод-центрированный радикал может вступать в реакцию с другим радикалом с образованием белка. Из исследований Штадтмана, Левина, используя глутаминсинтетазу стало ясно, что катализируемое металлом окисление белков является механизм посттрансляционной модификации, связывающей катион способен к окислительно-восстановительному циклированию (например, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) к металлическому переплету сайта на белке. Реакция с молекулярным кислородом или H_2O_2 генерирует активные формы кислорода которые окисляют аминокислоты. Факты говорят сами за себя что эти продукты реагируют специфичным для конкретного сайта образом, а реакция рассматривается как процесс “в клетке”, в котором частицы кислорода не выделяются в окружающую среду, а преимущественно реагируют с функциональными группами аминокислот остатков на месте связывания металла. В этом механизме предположили, что гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) является реактивным кислородом, образованным реакцией $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ (реакция Фентона). Другие активные формы кислорода (феррил-ион, перферрил-ион, пе-

роксирадикал) также могут образовывать. Многие белки могут быть модифицированы как *in vivo*, так и *in vitro* путем любой из ферментативных или неферментативных систем. Основными модификациями белка являются: потеря каталитических активностей, аминокислотные модификации, углерод-группа-образование, повышение кислотности, снижение термостойкости, изменение вязкости, изменение флуоресценции, фрагментация, образование белковых связей, образование S–S-мостиков и др. повышенная восприимчивость к протеолизу. С открытием того, что некоторые аминокислотные остатки (в том числе лизин, аргинин, пролин и треонин) окисляются до углерода, несколько методов определения содержания карбонила эти белки были выведены и использованы для измерения повреждения белков. Так как не все окислительные модификации приводят к карбонильным группам, это минимальные значения. Обратите внимание, что карбонильные группы также могут быть введены в белок с помощью механизмов, которые не включают окисление аминокислотных остатков. Таким образом, такие как 4-гидроксирадикал, образующийся при перекисном окислении было показано, что полиненасыщенные жирные кислоты вступают в реакцию с сульфгидрильными группами белков образуют стабильный ковалентный тиолэфирпродукты, несущие карбонильную функцию. Карбонильные группы также вводятся в белки заставляя их вступать в реакцию с карбонильными производными (кетонами, кетоальдегидами, дезоксиозонами) образуется как следствие реакции либо восстановления сахара или продукты их окисления с остатками лизина белки. Гарднер описал, что ряд ферментов с активными железосернистыми кластерами очень чувствительны к инактивации O_2^- . Одним из таких ферментов является аконитаза кишечной палочки. Механизм ингибирования аконитазы O_2^- в волнах высвобождения свободного железа из фермента, который усиливает кислородный стресс, и было высказано предположение, что генотоксичность супероксида может быть функцией его способности высвобождать связанное с белком железо. Теперь ясно что окисленные белки становятся лучшими субстратами для протеолитического переваривания и что

протеолитический путь может обеспечить линию “вторичной антиоксидантной обороны”. Это предложение было сделано Штадтманом в 1986 году. Сильная корреляция была такова продемонстрирована связь между повышенной гидрофобностью белка, а также распознавание и протеолитическая деградация окислительно модифицированные белки; кроме того, другие переменные могут также быть незначительны. Кишечная палочка по видимому обладает пятью специфическими протеиназами которые избирательно разлагают окисленные белки. В эукариотических клетках многие внутриклеточные белки разрушаются мультикаталитическим протеиназным комплексом, также называемый протеасомой, в нелизосомальном путь, было высказано предположение, что окисление белка может предрасполагают к вездесущности, которая, в свою очередь, станет мишенью для протеасомной деградации. Похоже, что после определенной степени окислительного повреждения, дальнейшее повреждение вызывает снижение в протеолитической восприимчивости. Несколько исследований показали, что сильно окисленные белки, интенсивно сшивающиеся и агрегированные, являются не только плохими субстратами для деградации, но и может также ингибировать протеазы для разложения других окисленных белков. Восстановление поврежденных белков необходимо для предотвращения их повреждения, которое может поставить под угрозу обмен веществ любой клетки, подверженной окислительному стрессу. Это явление было связано со старением у высших организмов. Вредные шоковые или стрессовые белки, как конститутивные, так и индуцибельные формы могут выступать в качестве компаньонов для воссоздания третичной структуры белков. Индукция различных шоковых белков также возникают при окислительном стрессе. Недавно, активация шаперона Hsp33 путем образования дисульфидной связи был описан индуцированный окислительным стрессом. Эта компаньонка имеет важное значение для защиты от окислительного стресса и может играть важную роль для удержания окисленных белков растворимыми, они должны быть либо уменьшены и регенерированы, либо деградированы клеточные протеазы. Хотя несколько меха-

низмов окисления белка как известно в деталях, большинство исследований проводилось *in vitro* системы. *In vivo* модификации белков обусловленные окислением стресса был гораздо менее изучен, особенно из-за трудно идентифицировать модифицированные белки в цельном экстракте. С этой целью была разработана техника уэстерн-блоттинга, взявшая за основу преимущество, что образующиеся углеродные группы вступают в реакцию с динитрофенилгидразин, и что дериватизированные белки могут быть разделены SDS-PAGE и затем проанализированы на содержание карбонила методом иммуноанализа с анти-ДНП-антителами. Этот метод был использован для проверки относительной восприимчивости белков к окислительной модификации, стимулированной при *E. coli* клетки, растущие аэробно, были экспонированы до H₂O₂ или менадион(соединение генератора супероксида). Белки в различных клеточных процессах, такие как катаболизм глюкозы, функция шаперона (DNA K), синтез белка (EF-G), внешний мембранные белки (OmpA) и β -субъединица ATPase были идентифицированы. Среди этих белков EF-G и β -субъединица ТПаза сильно окислялась применадион. Инактивация этих двух ферментов может быть решающим шагом, чтобы остановить стресс и, следовательно, минимизировать повреждение клеток, процесс, имеющий ту же цель, что и индукция GADD (остановка роста и DNA повреждение) генов при окислительном стрессе. С этой точки зрения окислительная модификация и инактивация некоторых белков-результат цены, которую платят клетки использующие кислород.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе объектами исследования были штаммы бактерии *E. coli*, предоставленные Клиникой ФГБОУ ВО БГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ, выделенные из клинического образца; питательные среды: агар Плоскирева (ФБУН ГНЦ МПБ), среда Левина (ФБУН ГНЦ МПБ), XLD-агар(ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар) (ФБУН ГНЦ МПБ), БТН-агар (ООО Биотехновация), агар Эндо (ФГУП НПО Микроген).

Методы исследования:

1. Метод культивирования микроорганизмов на питательных средах. Посев - один из стационарных методов культивирования микроорганизмов на питательных средах, применяемый для культурально-морфологической диагностики в медицинской микробиологии, а также для исследования биохимических и биологических свойств в различных биотехнологических целях. Подборка условий культивирования (время, температура, стрессовые факторы и др.).

Приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов:

1. Взвешивание: отбирают навески компонентов питательной среды на аналитических весах;

2. Растворение: компоненты питательной среды растворяют в предварительно нагретой до 70 °С дистиллированной воде. Растворы макросолей и микросолей готовят отдельно. Растворы фосфатов входящих в состав макросолей также готовят отдельно, так как в процессе стерилизации в автоклаве они выпадают в осадок и в дальнейшем вновь требуют растворения.

3. Кипячение: растворы питательных сред кипятят на водяной бане в течении 2 мин.

4. Установление pH: ориентировочно производят с помощью индикаторной бумаги, для точного определения пользуются потенциометром. При стерилизации pH снижается на 0,2, поэтому сначала готовят более щелочной раствор.

5. Фильтрация жидких и расплавленных плотных сред производят через влажный бумажный или матерчатый фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена - они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

6. Розлив сред: питательные среды разливают не более чем на 3/4 емкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.

7. Стерилизация: для стерилизации питательных сред используют термический способ: стерилизация насыщенным паром под давлением автоклавирование, дробная стерилизация тиндализация, кипячение. Режим стерилизации зависит от состава среды и указан в её рецепте. При автоклавировании 3-5 % жидкости теряется в результате испарения, поэтому рекомендуется в приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5 % дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда будет иметь требуемую концентрацию.

8. Контроль:

- для контроля стерильности среды ставят на 2 суток в термостат, после чего их просматривают.

- химический контроль окончательно устанавливает pH, содержание общего и амминого азота, пептона, хлоридов.

- для биологического контроля несколько образцов среды засевают специально подобранными культурами, и по их росту судят о питательных свойствах среды [2].

1.1. БТН-агар - плотная питательная среда (питательный агар для культивирования микроорганизмов, сухой). Представляет собой мелкодисперсный гомогенный, гигроскопичный, светочувствительный порошок светлоскремового цвета. Состав г/л. (гидролизат ферментативный белковый - 10,5 г, пептон ферментативный, сухой - 10,5 г, экстракт автолизированных дрожжей осветленный - 2,0 г, агар микробиологический - 12,0 г, натрий хлорид - 5,0 г).

Производили подсчёт необходимого количества сухой среды, на 3 чашки Петри – $40\text{г} \cdot 75/1000 = 3\text{г}$ среды на 75мл. дистиллированной воды взвешивали необходимое количество сухой среды на аналитических весах. Кипятили среду с дистиллированной водой до полного расплавления агара, в водяной бане. Стерилизовали при температуре 121 °С в течение 15 мин. Среду охладили до температуры 50 °С, разлили в стерильные чашки Петри.

1.2. Агар Эндо-дифференциально-диагностическая питательная среда, предназначенная для выделения энтеробактерий. Состав г/л. (питательный агар сухой - 26.5 г, ЭКДА - 1.22 г, фуксин основной - 0.23 г, сахар молочный - 10.7 г, динатрия фосфат - 0.48 г, натрия сульфат безводный - 0.83 г, натрия карбонат - 0.03 г).

Производили подсчёт необходимого количества сухой среды, на 3 чашки Петри - $40\text{г} \cdot 75/1000 = 3\text{г}$ среды на 75мл. дистиллированной воды взвешивали необходимое количество сухой среды на аналитических весах. Кипятили среду с дистиллированной водой 3 мин. до полного расплавления агара, в водяной бане. Среду охладили до температуры 45-50 °С, разлили в стерильные чашки Петри.

1.3. Агар-Плоскирева - питательная среда предназначена для выделения *Shigella*, *Salmonella spp.* и дифференциации от других колиморфных лактозо-ферментирующих энтеробактерий из клинического материала (фекалии, моча и др.). Состав г/л. (панкреатический гидролизат рыбной муки с тиосульфатом и цитратом натрия - 34.5 г, экстракт пекарных дрожжей - 5 г, натрий фосфорнокислый двузамещенный - 2 г, лактоза - 10 г, желчь очищенная сухая - 7 г, натрий хлористый - 1 г, йод - 0.04 г, нейтральный красный - 0.04 г, бриллиантовый зеленый - $33 \cdot 10^{-5}$ г, агар - 9 ± 2).

Производили подсчёт необходимого количества сухой среды, на 3 чашки Петри - $65,5 \cdot 75/1000 = 4,9$ г среды на 75мл. дистиллированной воды взвешивали необходимое количество сухой среды на аналитических весах. Кипятили среду с дистиллированной водой в течении 2-3 мин., перемешивая

до полного расплавления агара в водяной бане. Охладили до температуры 40-45 °С. Разлили в стерильные чашки Петри.

1.4. Среда Левина - это цветная элективная питательная среда, применяемая для дифференцирования микроорганизмов кишечной группы при микробиологической диагностике кишечных инфекций - брюшного тифа, сальмонеллез, дизентерии, колиэнтеритов. Состав г/л. (панкреатический гидролизат рыбной муки - 12 г, экстракт пекарных дрожжей импортный - 1 г, Д-(+) - лактоза - 10 г, натрия гидрофосфат - 0.7 г, натрия хлорид - 4.2 г, эозин-Н - 0.4 г, метиленовый синий - 0.065 г, агар - 9 ± 3 г).

Производили подсчёт необходимого количества сухой среды, на 3 чашки Петри - $37 \cdot 75 / 1000 = 2,8$ г среды на 75мл. дистиллированной воды взвешивали необходимое количество сухой среды на аналитических весах. Кипятили среду с дистиллированной водой в течении 3 мин., перемешивая до полного расплавления агара в водяной бане. Автоклавировали при температуре 110 °С в течении 20 минут. Охладили до температуры 40-45 °С. Разлили в стерильные чашки Петри.

1.5. XLD-агар - (ксилозо-лизин-дезоксихолатная агаровая среда) - для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий, в частности, сальмонелл и шигелл при проведении бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии. Состав г/л. (Д(+)-ксилоза - 3.5 г, L - лизин гидрохлорид - 5 г, Д(+)-лактоза 1-водная - 7.5 г, сахароза - 7.5 г, натрий хлористый - 5 г, дрожжевой экстракт - 3 г, желчь очищенная сухая - 2.5 ± 0.5 г, дезоксихолат натрия - 1.5 г, натрия тиосульфат - 6.8 г, железо(III) лимонноамиачное зеленое - 0.8 г, феноловый красный - 0.08 г, натрий углекислый - 0.1- 0.3 г, агар 10 ± 3 г).

Производили подсчёт необходимого количества сухой среды, на 3 чашки Петри - $53,5 \cdot 75 / 1000 = 4$ г среды на 75мл. дистиллированной воды взвешивали необходимое количество сухой среды на аналитических весах. Кипятили среду с дистиллированной водой в течении 2 мин., перемешивая до

полного расплавления агара в водяной бане. Охладили до температуры 40-45 °С, разлили в стерильные чашки Петри.

Для формирования искусственного окислительного стресса в клетках бактерий *E. coli*, в среду культивирования добавляли водный раствор NaCl (1 мл.).

Чашки Петри с *E. coli* инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч.

2. Метод изучения процессов хемилюминесценции сред культивирования микроорганизмов.

Хемилюминесцентные методы изучения свободно-радикальных процессов выгодно отличаются тем, что при минимальном количестве исследуемой пробы позволяют непрерывно следить за образованием радикалов в естественных условиях, не вмешиваясь в сам ход реакций. Они не требуют особых лабораторных условий и специальной подготовки материала к анализу, чувствительны, надежны, отвечают требованиям, предъявляемым к экспресс-способам исследования.

Использование хемилюминесцентных методов открывают новые возможности при поиске биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами, изучении механизма их действия, сравнении активности как в модельных системах, так и при введении в организм. Существенным достоинством этого способа является оперативность получения информации об изменении свободно-радикального окисления в организме при назначении препарата.

В целом, образование активных форм кислорода и перекисное окисление липидов являются достаточно вероятным с энергетической точки зрения процессами, для которых в биологическом материале имеются благоприятные условия. Причем, чем выше скорость свободно-радикального окисления, тем интенсивнее свечение [52].

Влияние сред на АФК было изучено в модельной системе, состоящей из фосфатного буфера (20 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl , $\text{pH} = 7,5$) с цитратом натрия (50 мМ) и люминолом (10-5М). К 20 мл полученного раствора добавляли 1 мл раствора сернокислого железа (50мМ). Окисление солей железа инициировало появление кислородных радикалов и сопровождалось хемилюминесценцией, усиливающейся в присутствии люминола. Свечение регистрировали в течение 5 минут.

В контрольных опытах хемилюминесценцию измеряли в указанных модельных системах без добавления питательных сред, в опыте - при внесении в модельную систему 1 мл питательной среды. Твердые среды перед внесением в модельную систему, прогревали в водяной бане до полного плавления агара.

Измерение ХЛ исследуемых сред в динамике - на 1, 7, 14, 21 сутки для выявления изменений параметров сред культивирования, отражающих окислительные процессы в средах культивирования микроорганизмов.

Исследование влияния изменения условий (разные питательные среды, исследование ХЛ в динамике, добавление стресс-фактора водного раствора NaCl для культивирования микроорганизмов на свободно-радикальное окисление.

Регистрацию свечения осуществляли на приборе «ХЛМ-003».

Статистическую обработку результатов проводили, используя пакет программ «StatisticaforWindows (release 5.0)». Изменения показателей (суммы свечения) хемилюминесценции рассчитывали в процентах от контроля, который был принят за 100%.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Результаты культивирования микроорганизмов на питательных средах

Было приготовлено по 3 пробы каждой исследуемой питательной среды: 1.Среда культивирования МО; 2.Среда МО, в которой культивировались бактерии *E. coli*; 3.Среда МО, в которой культивировались бактерии *E. coli*, с добавлением стресс-фактора водного раствора NaCl.

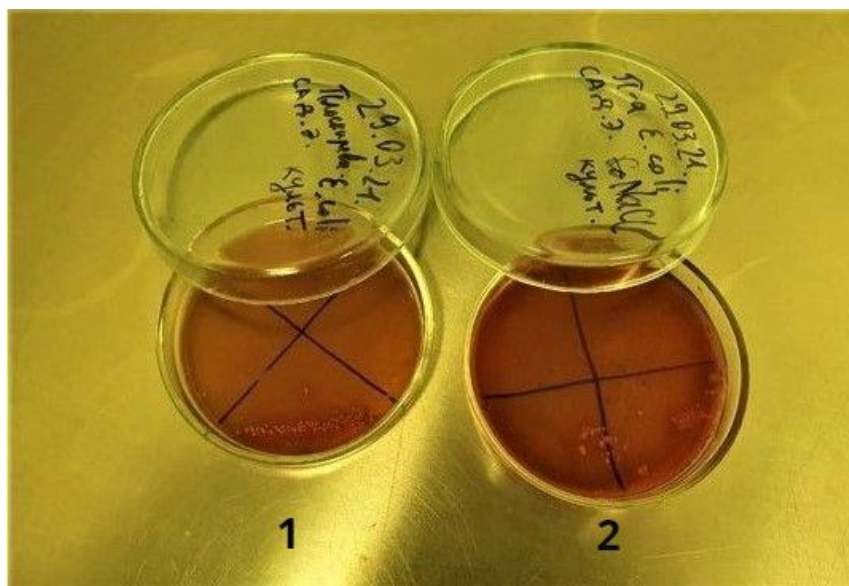


Рисунок 1. 1 - Среда Плоскирева + *E. coli*, 2 - Среда Плоскирева + *E. coli* + NaCl.



Рисунок 2. 1 - Среда Левина + *E. coli*, 2 - Среда Левина + *E. coli* + NaCl.

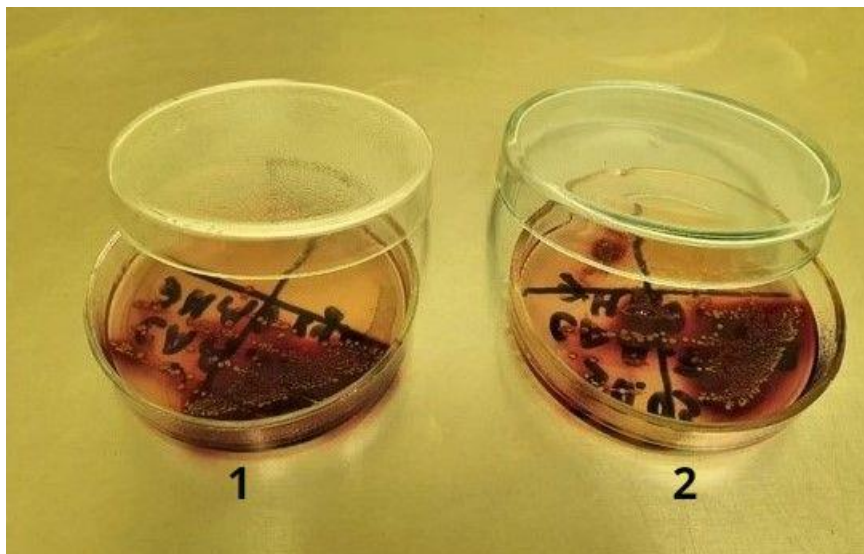


Рисунок 3. 1 - Среда Эндо + *E. coli*, 2 - Среда Эндо + *E. coli* + NaCl.

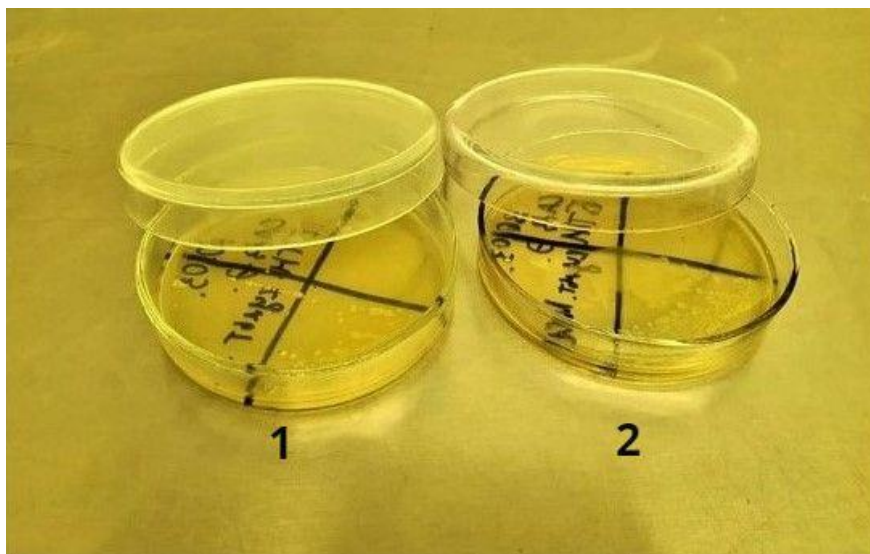


Рисунок 4. 1 - Среда БТН + *E. coli*, 2 - Среда БТН + *E. coli* + NaCl.

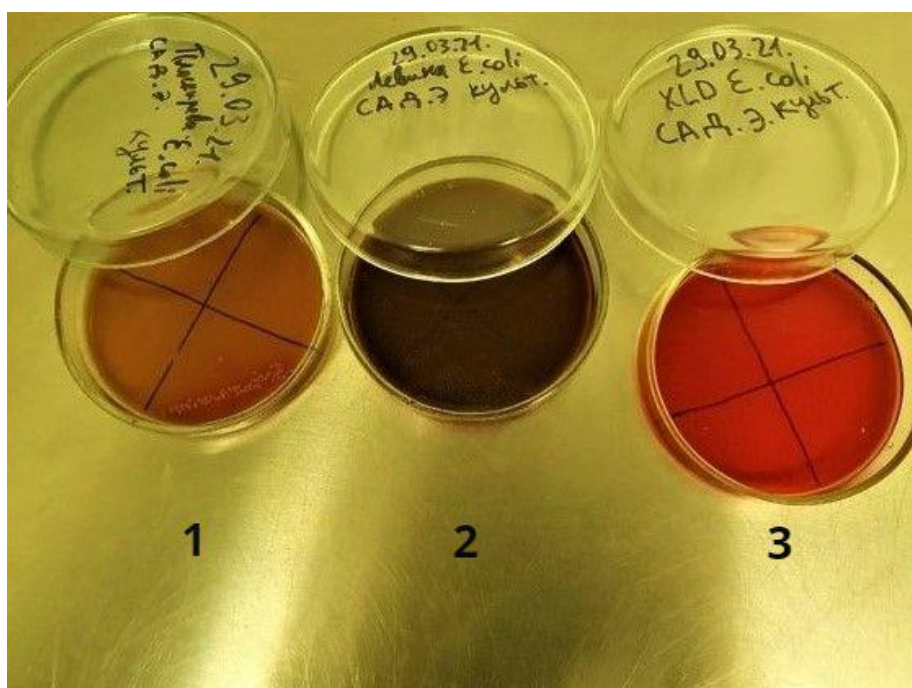


Рисунок 5. 1 - Среда Плоскирева + *E. coli*, 2 - Среда Левина + *E. coli*, 3 - Среда XLD + *E. coli*.

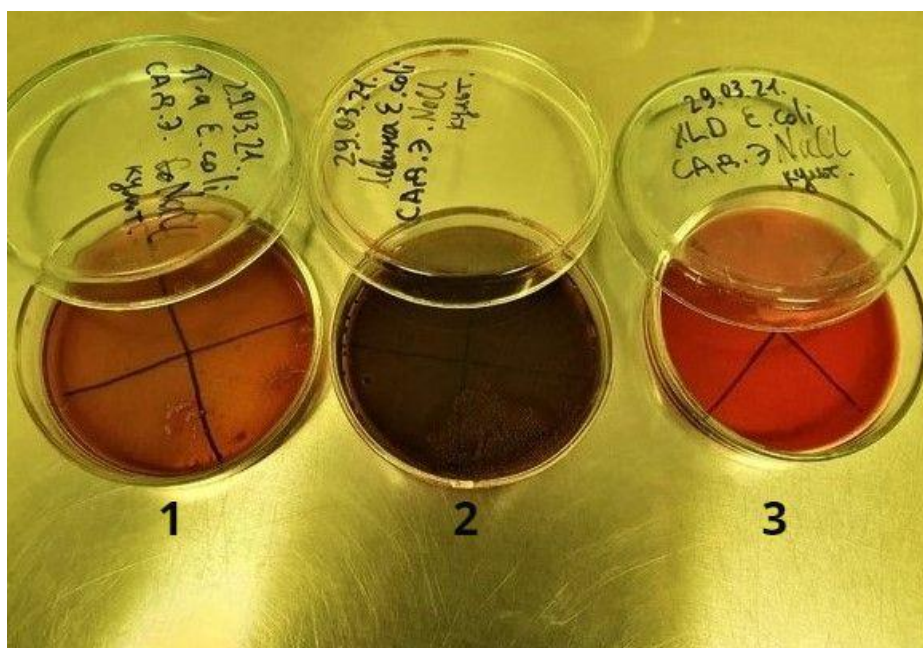


Рисунок 6. 1 - Среда Плоскирева + *E. coli* + NaCl, 2 - Среда Левина + *E. coli* + NaCl, 3 - Среда XLD + *E. coli* + NaCl.

3.2. Изучение процессов хемилюминесценции сред культивирования микроорганизмов

Было исследовано влияние некоторых сред, используемых для культивирования микроорганизмов, на процессы свободно-радикального окисления в модельной системе генерации активных форм кислорода.

Для изучения процессов образования свободных радикалов, питательные среды добавляли в модельную систему АФК и по изменению ХЛ сопровождающей процессы окисления судили об интенсивности образования свободных радикалов. Соответственно по изменению показателей ХЛ можно судить об антиоксидантной активности микробиологических сред.

На рис. 7 представлена типичная запись хемилюминесценции модельной системы, в которой вызывали образование активных форм кислорода.

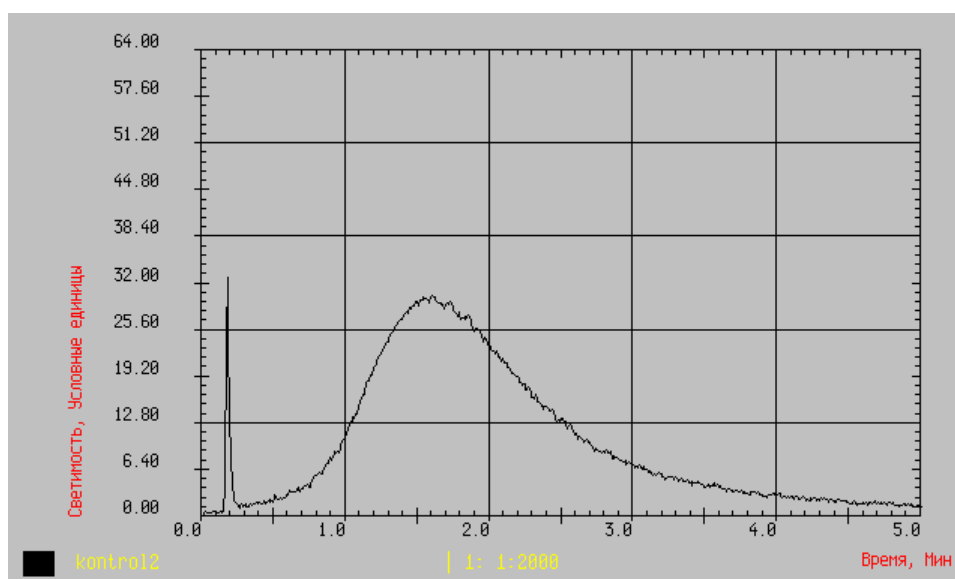


Рисунок 7. Запись хемилюминесценции модельной системы, в которой происходит образование активных форм кислорода.

Хемилюминограммы модельной системы, где генерируются активные формы кислорода, оценивали по следующим параметрам хемилюминесценции: светосумма, спонтанная светимость, вспышка в момент введения инициатора, максимальная светимость. Наиболее информативными показателями хемилюминесценции служила светосумма.

3.3. Влияние исследуемых сред на параметры хемилюминесценции в динамике

Были подобраны питательные среды с различным элементным составом и исследованы параметры изменений ХЛ в динамике на 1, 7, 14, 21 день.

В результате проделанной работы было изучено влияние некоторых питательных сред на процессы хемилюминесценции в динамике и были выявлены изменения показателей ХЛ.

На первые сутки культивирования было отмечено увеличение параметров светосуммы ХЛ в среде XLD-агар, а на 7, 14 и 21 сутки в данной среде было отмечено снижение показателей процессов свободно-радикального окисления.

В средах: БТН-агар, агар Эндо было отмечено увеличение показателей светосуммы ХЛ в исследуемый период времени (таблица 1).

Таблица 1

Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции сред при их добавлении в модельную систему, генерирующей активные формы кислорода в динамике (контроль принят за 100%).

Среда культивирования	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Контроль	100	100	100	100
XLD-агар	165	73	30	70
БТН-агар	157	395	290	364
Агар Эндо	176	216	188	240
Среда Левина	722	282	166	487
Агар Плоскирева	204	130	50	195

При добавлении в модельную систему исследуемых сред: Эндо, БТН, Плоскирева, было обнаружено увеличение показателей светосуммы хемилюминесценции на 1, 7, 14, 21 сутки исследования. В таблице 2 отображено

влияние исследованных сред на процессы генерации активных форм кислорода в динамике (контроль принят за 100%).

Таблица 2

Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции сред при их добавлении в модельную систему в динамике (контроль принят за 100%).

Проба	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
	светосумма	светосумма	светосумма	светосумма
Контроль	100	100	100	100
Эндо	176	216	188	240
БТН	157	395	290	364
Плоскирева	203	130	50	195

Оценка динамики параметров хемилюминесценции питательных сред в сравнении в разные сроки культивирования микроорганизмов.

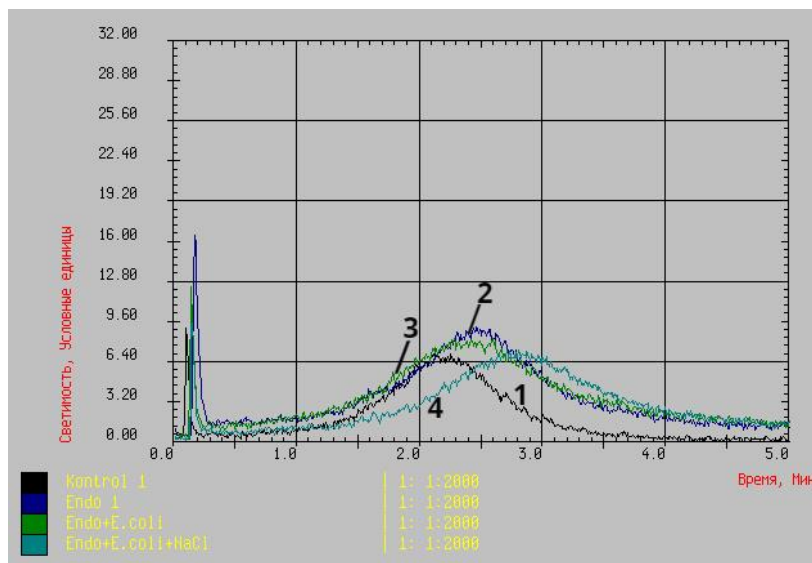


Рисунок 8. Влияние агара Эндо (ФГУП НПО Микроген), на генерацию АФК в 1 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-агар Эндо, 3-агар Эндо+*E.coli*, 4-агар Эндо+*E.coli*+NaCl

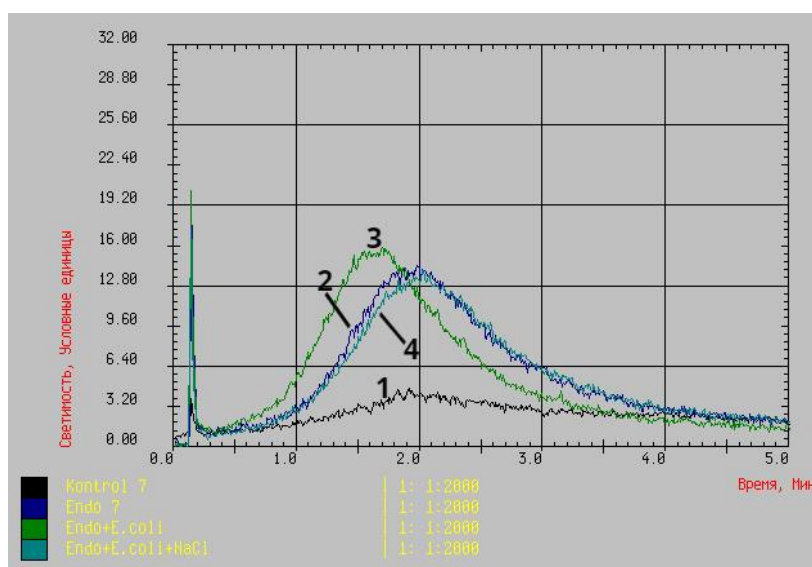


Рисунок 9. Влияние агара Эндо (ФГУП НПО Микроген), на генерацию АФК в 7 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-агар Эндо, 3-агар Эндо+*E.coli*, 4-агар Эндо+*E.coli*+NaCl

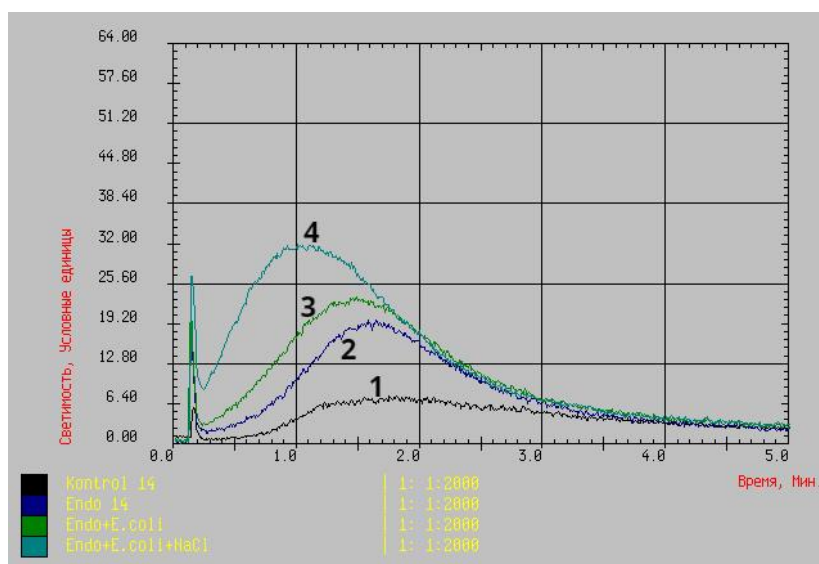


Рисунок 10. Влияние агара Эндо (ФГУП НПО Микроген), на генерацию АФК в 14 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-агар Эндо, 3-агар Эндо+*E.coli*, 4-агар Эндо+*E.coli*+NaCl

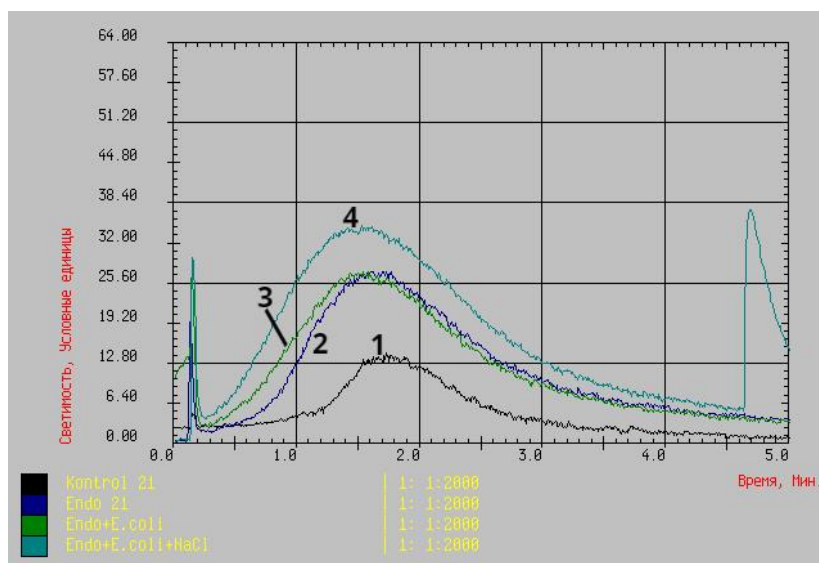


Рисунок 11. Влияние агара Эндо (ФГУП НПО Микроген), на генерацию АФК в 21 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-агар Эндо, 3-агар Эндо+*E.coli*, 4-агар Эндо+*E.coli*+NaCl

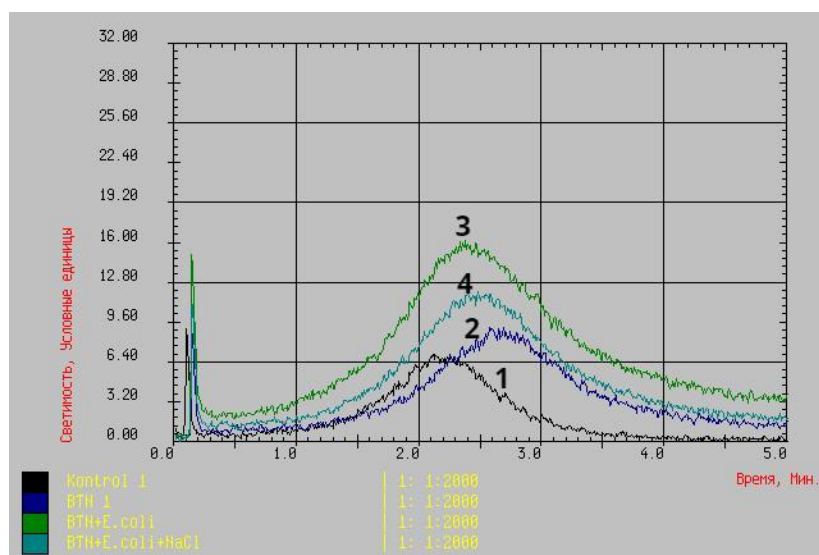


Рисунок 12. Влияние БТН-агара (ООО Биотехновация), на генерацию АФК в 1 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-БТН-агар, 3-БТН-агар+*E.coli*, 4-БТН-агар+*E.coli*+NaCl

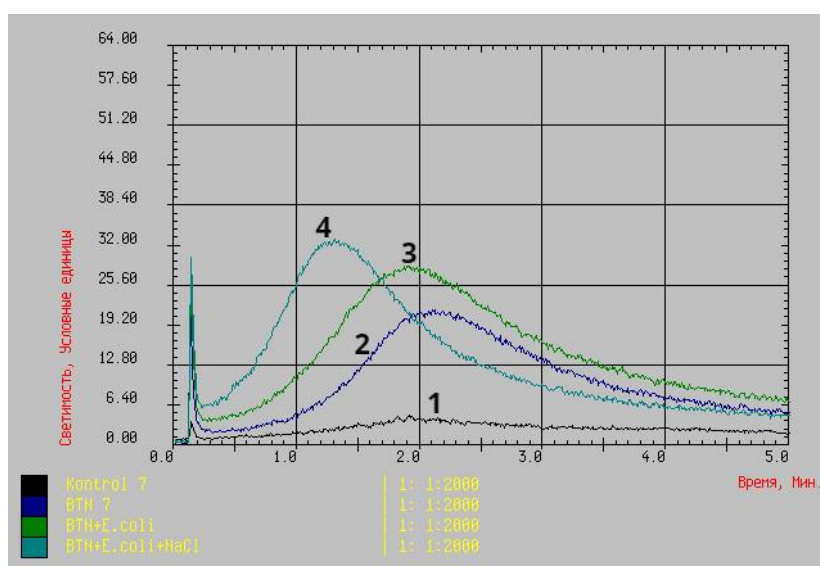


Рисунок 13. Влияние БТН-агара (ООО Биотехновация), на генерацию АФК в 7 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-БТН-агар, 3-БТН-агар+*E.coli*, 4-БТН-агар+*E.coli*+NaCl

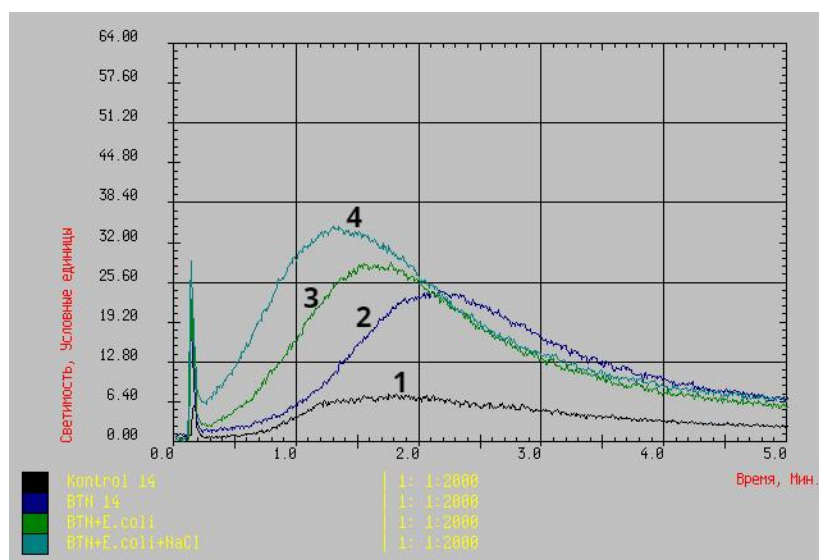


Рисунок 14. Влияние БТН-агара (ООО Биотехновация), на генерацию АФК в 14 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-БТН-агар, 3-БТН-агар+*E.coli*, 4-БТН-агар+*E.coli*+NaCl

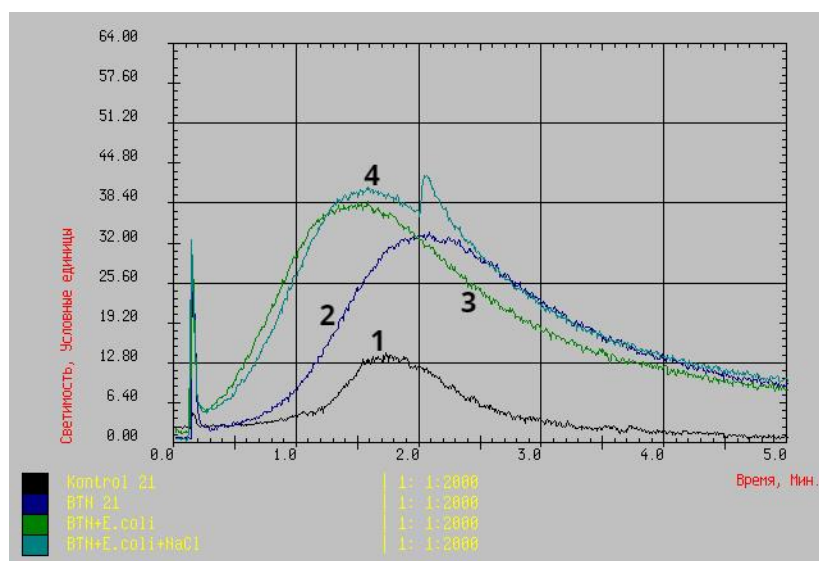


Рисунок 15. Влияние БТН-агара (ООО Биотехновация), на генерацию АФК в 21 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-БТН-агар, 3-БТН-агар+*E.coli*, 4-БТН-агар+*E.coli*+NaCl

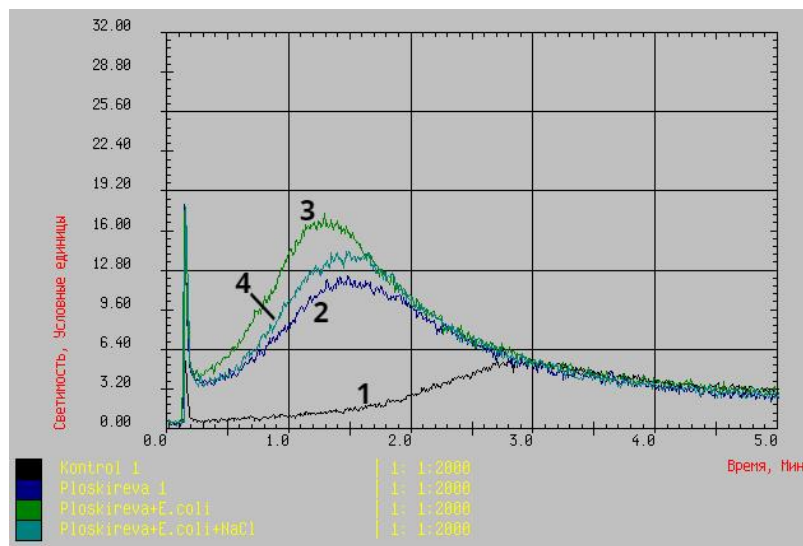


Рисунок 16. Влияние агара Пlosкирева (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 1 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-агар Пlosкирева, 3-агар Пlosкирева+*E.coli*, 4-агар Пlosкирева+*E.coli*+NaCl

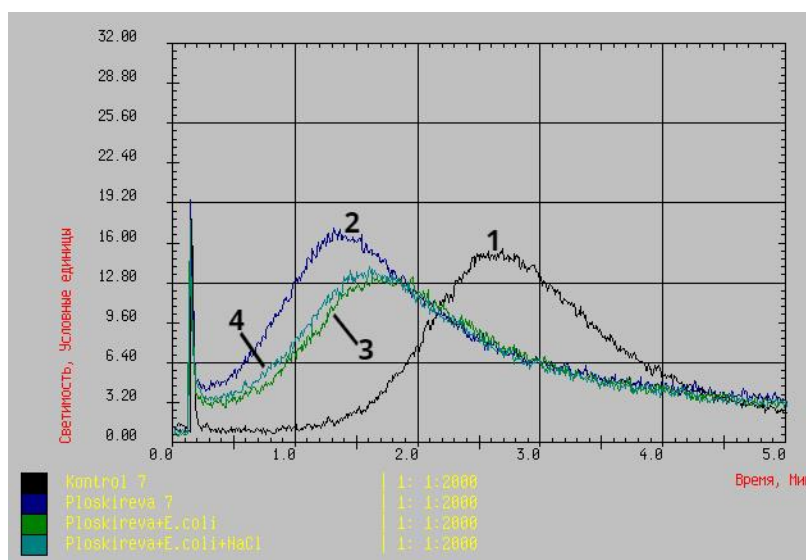


Рисунок 17. Влияние агара Пlosкирева (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 7 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-агар Пlosкирева, 3-агар Пlosкирева+*E.coli*, 4-агар Пlosкирева+*E.coli*+NaCl

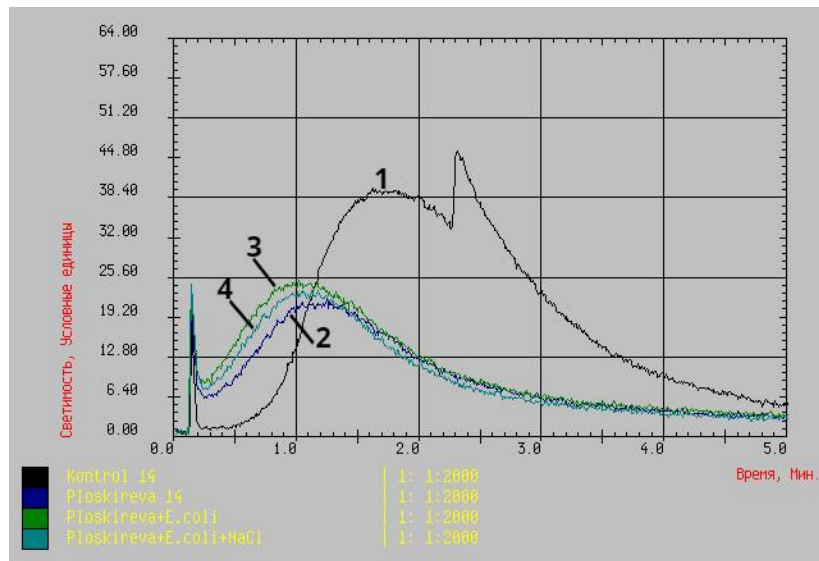


Рисунок 18. Влияние агара Пlosкирева (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 14 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-агар Пlosкирева, 3-агар Пlosкирева+*E.coli*, 4-агар Пlosкирева+*E.coli*+NaCl

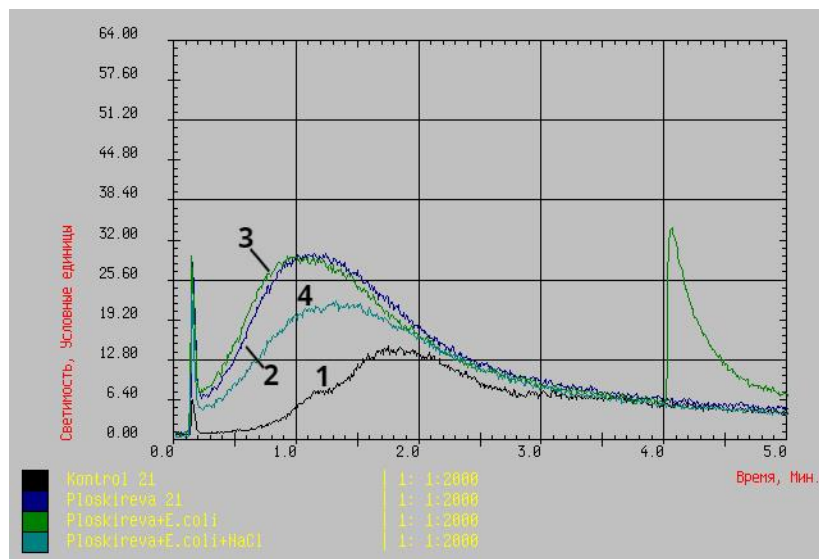


Рисунок 19. Влияние агара Пlosкирева (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 21 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-агар Пlosкирева, 3-агар Пlosкирева+*E.coli*, 4-агар Пlosкирева +*E.coli*+NaCl

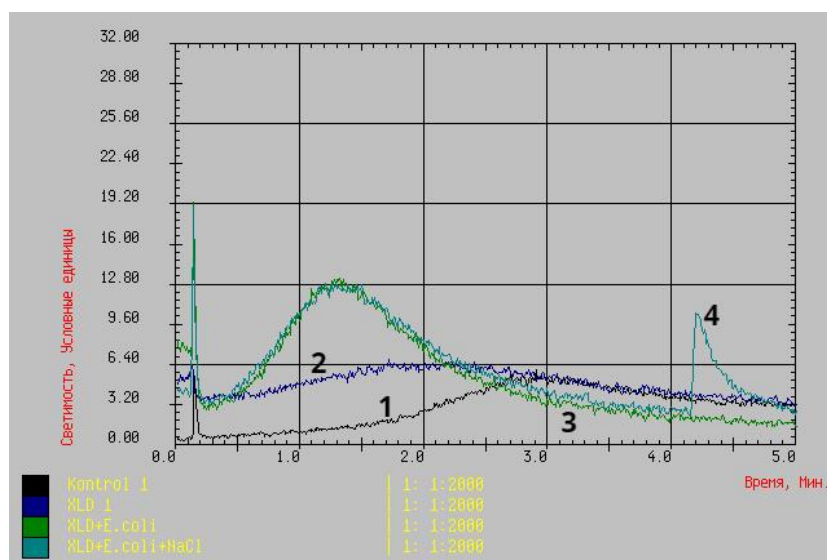


Рисунок 20. Влияние XLD-агара (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 1 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-XLD-агар, 3-XLD-агар+*E.coli*, 4-XLD-агар+*E.coli*+NaCl

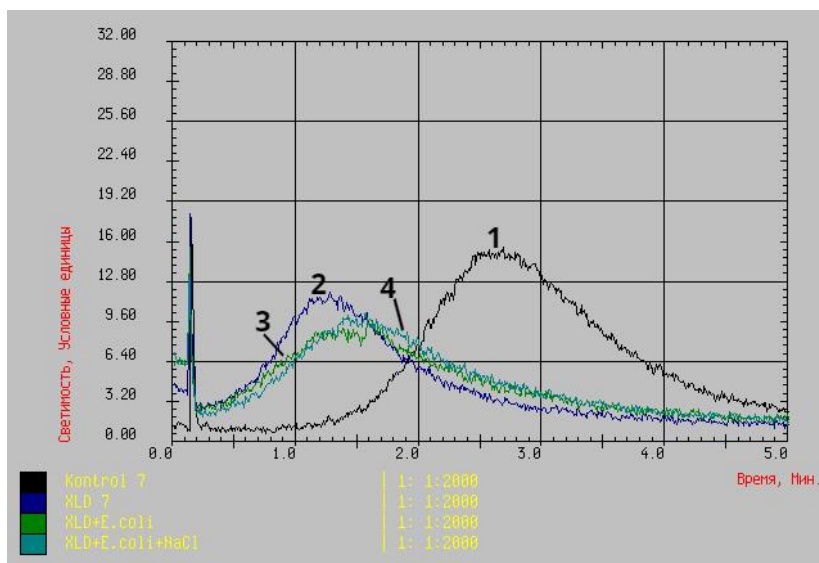


Рисунок 21. Влияние XLD-агара (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 7 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-XLD-агар, 3-XLD-агар+*E.coli*, 4-XLD-агар+*E.coli*+NaCl

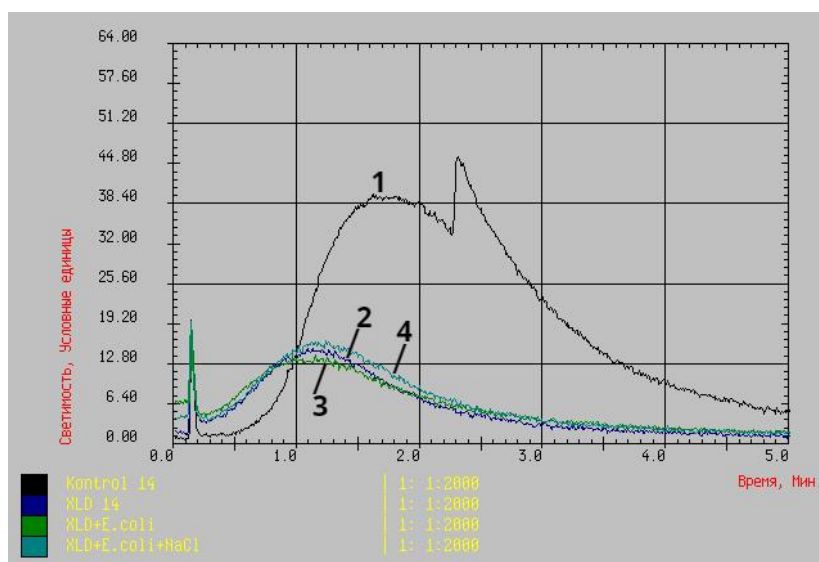


Рисунок 22. Влияние XLD-агара (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 14 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-XLD-агар, 3-XLD-агар+*E.coli*, 4-XLD-агар+*E.coli*+NaCl

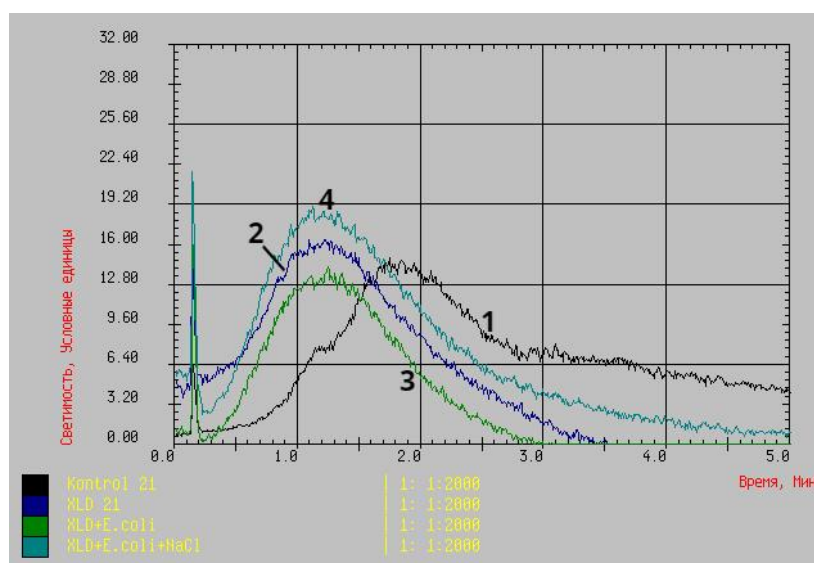


Рисунок 23. Влияние XLD-агара (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 21 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-XLD-агар, 3-XLD-агар+*E.coli*, 4-XLD-агар+*E.coli*+NaCl

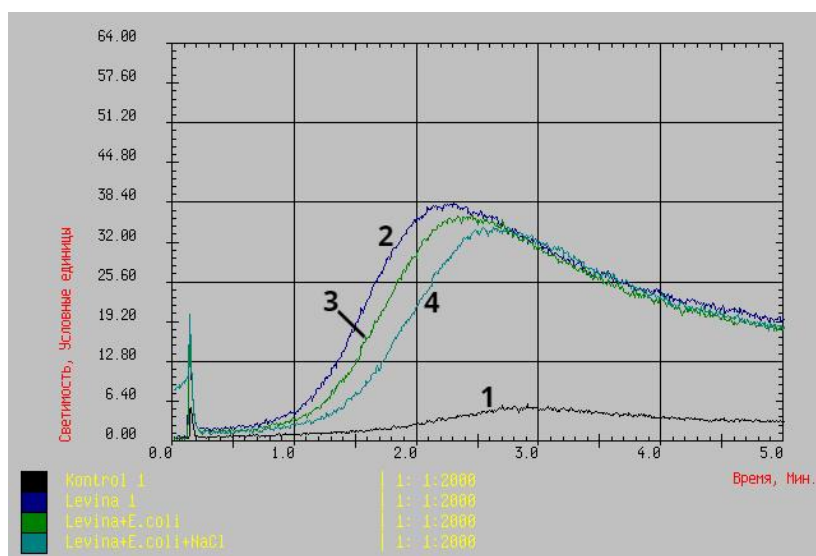


Рисунок 24. Влияние среды Левина (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 1 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-Левина, 3-Левина+E.coli, 4-Левина+E.coli+NaCl

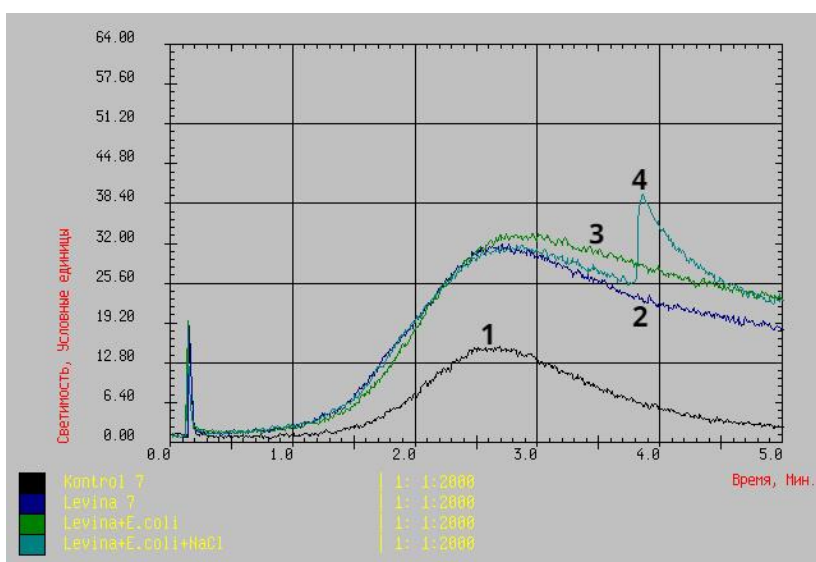


Рисунок 25. Влияние среды Левина (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 7 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-Левина, 3-Левина+E.coli, 4-Левина+E.coli+NaCl

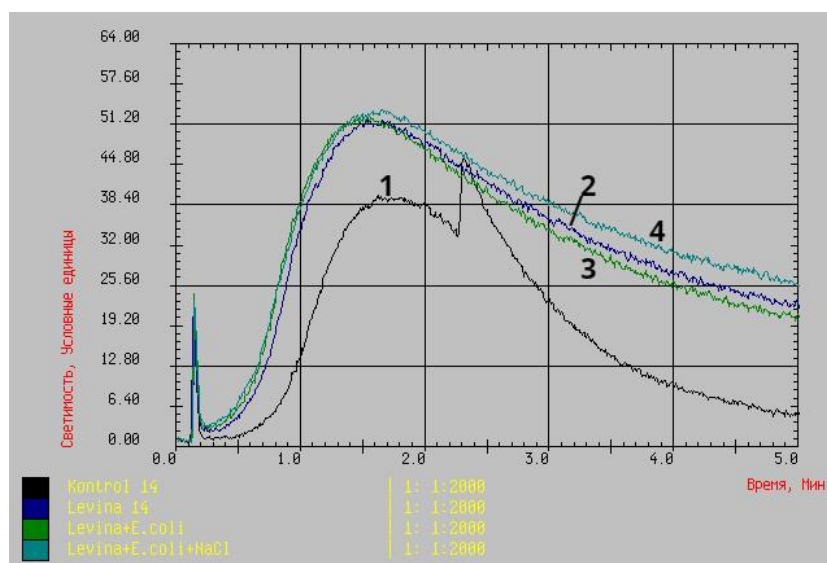


Рисунок 26. Влияние среды Левина (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 14 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-Левина, 3-Левина+*E.coli*, 4-Левина+*E.coli*+NaCl

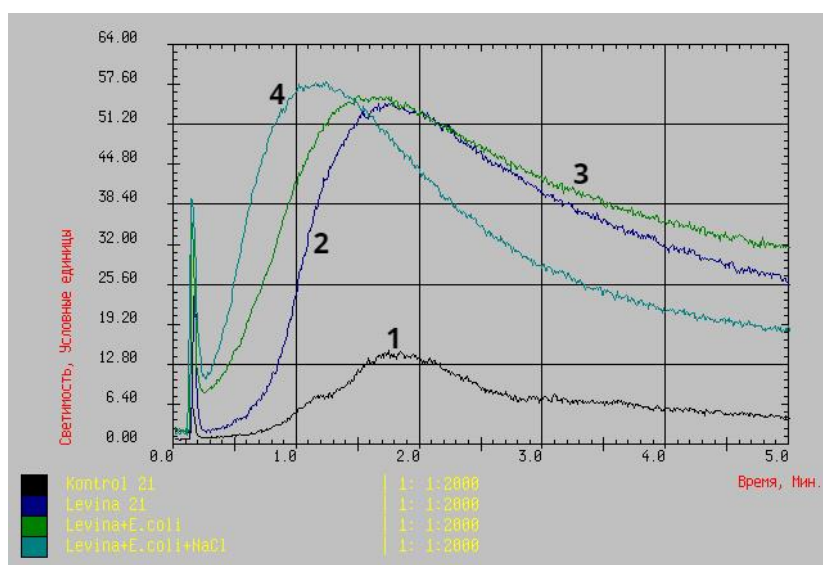


Рисунок 27. Влияние среды Левина (ФБУН ГНЦ МПБ), на генерацию АФК в 21 сутки культивирования *E. coli*. 1-контроль, 2-Левина, 3-Левина+*E.coli*, 4-Левина+*E.coli*+NaCl

3.4. Исследование процессов СРО в средах с культивированным в них микроорганизмом

Подобранные условия культивирования микроорганизмов в исследуемых питательных средах влияют на ХЛ по-разному. Были выявлены 2 группы сред с различными показателями светосуммы ХЛ после культивирования бактерий.

В первой группе сред при культивировании *E. coli* возрастали показатели ХЛ, в эту группу вошли среды: Эндо, БТН, XLD (табл. 3).

Таблица 3

Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции сред с культивированным в них МО при их добавлении в модельную систему в динамике (контроль принят за 100%).

Проба	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
	светосумма	светосумма	светосумма	светосумма
Контроль	100	100	100	100
Эндо	176	216	188	240
Эндо+Е.с.	178	210	236	252
БТН	157	395	290	364
БТН+Е.с.	355	560	327	423
XLD	165	73	30	70
XLD+Е.с.	182	75	32	42

Во второй группе сред показатели ХЛ снижались, в эту группу вошли среды: среда Левина (табл. 4).

Таблица 4

Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции сред с культивированным в них МО при их добавлении в модельную систему в динамике (контроль принят за 100%).

Проба	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
	светосумма	светосумма	светосумма	светосумма
Контроль	100	100	100	100
Левина	722	282	166	487
Левина+Е.с.	659	312	164	560

Оценка динамики хемилюминесценции сред культивирования МО в течении различных суток

Рисунок 28. Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции среды Endo при различных условиях культивирования в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода в динамике.

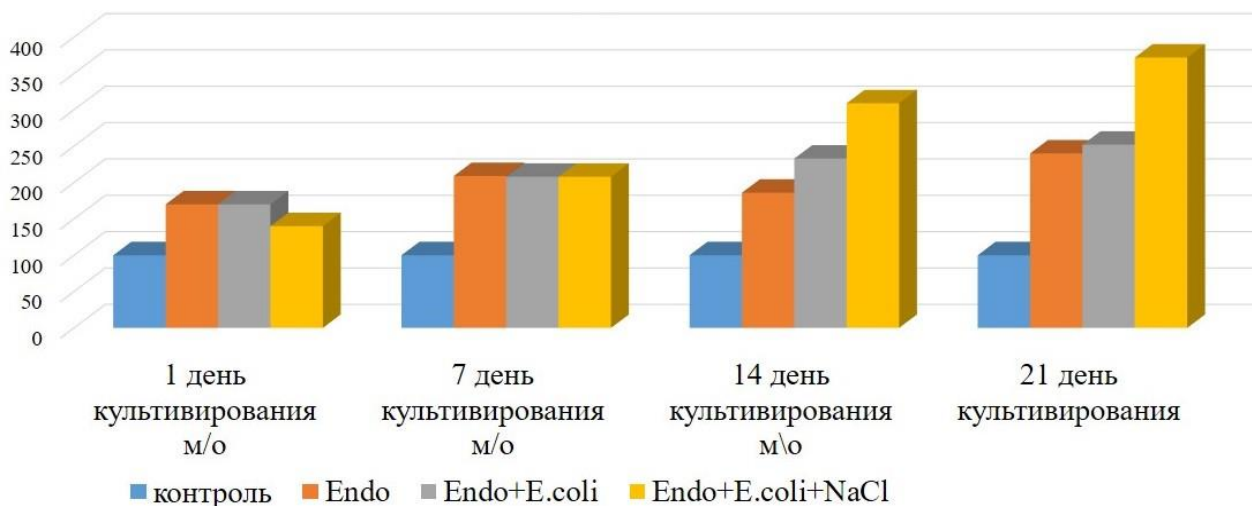


Рисунок 29. Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции среды BTN при различных условиях культивирования в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода в динамике.

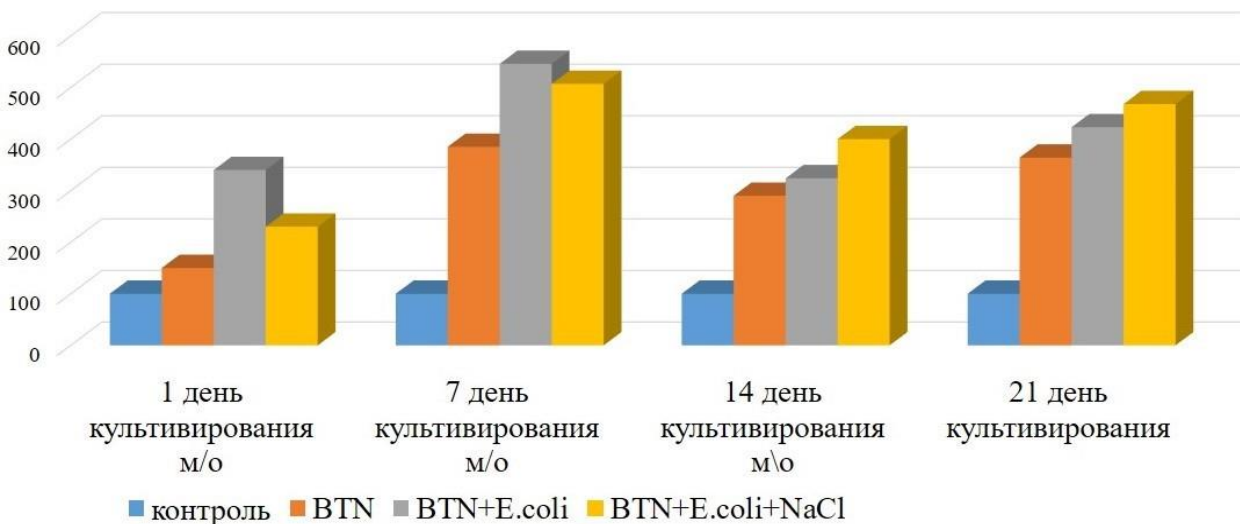


Рисунок 30. Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции среды Ploskireva при различных условиях культивирования в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода в динамике.

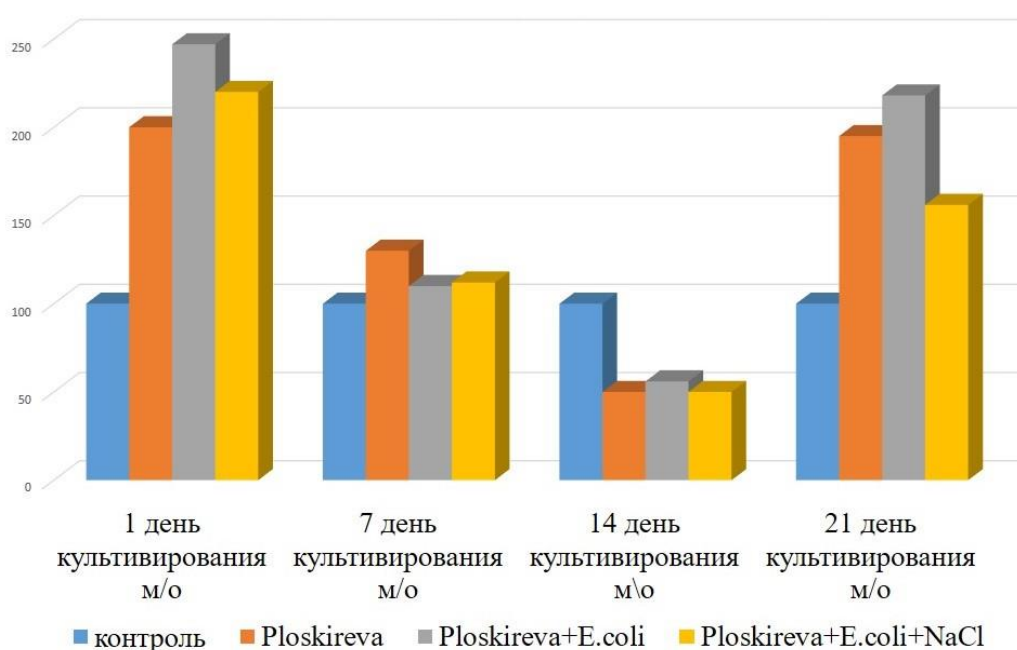


Рисунок 31. Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции среды XLD при различных условиях культивирования в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода в динамике.

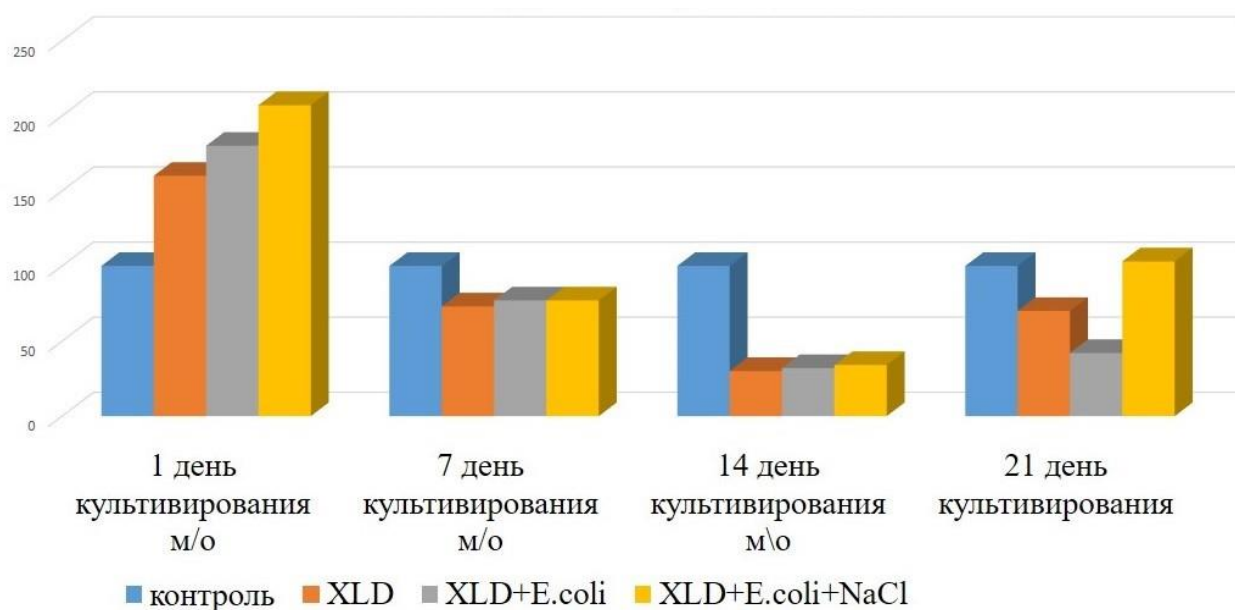
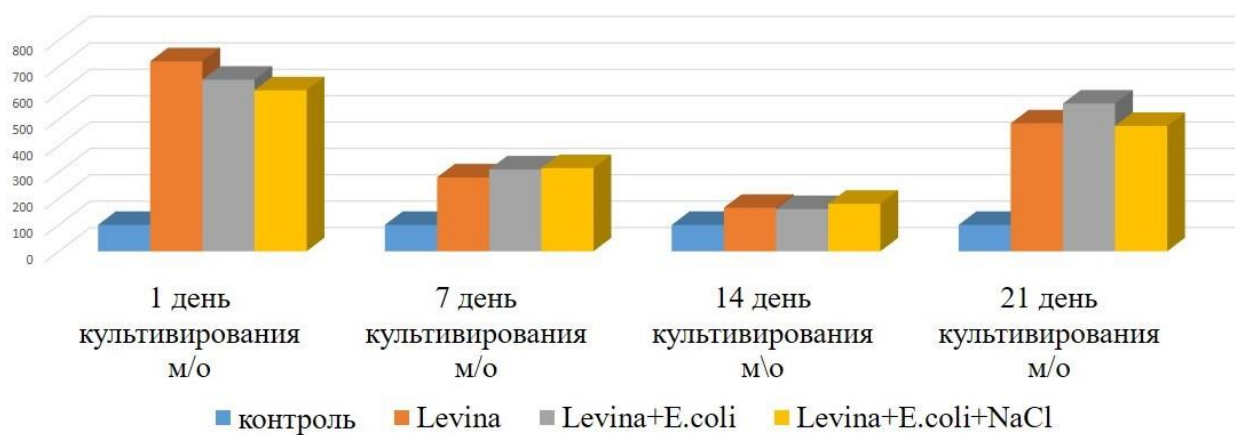


Рисунок 32. Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции среды Levina при различных условиях культивирования в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода в динамике.



3.5. Исследование влияния стресс-фактора NaCl на изменения параметров ХЛ (светосумма)

Добавление водного раствора NaCl для создания искусственного окислительного стресса, в исследуемых средах с культивированным в них микроорганизмом не привело значительным изменениям параметров светосуммы ХЛ (табл.5).

Таблица 5

Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции сред с раствором NaCl при их добавлении в модельную систему в динамике (контроль принят за 100%).

Проба	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
	све-ма	све-ма	све-ма	све-ма
Контроль	100	100	100	100
Эндо+Е.с.	178	210	236	252
Эндо+Е.с.+NaCl	147	211	312	372
БТН+Е.с.	355	560	327	423
БТН+Е.с.+NaCl	236	520	406	468
XLD+Е.с.	182	75	32	42
XLD+Е.с.+NaCl	209	76	34	103
Левина+Е.с.	659	312	164	560
Левина+Е.с.+NaCl	618	317	180	477
Плоскирева+Е.с.	250	109	56	218
Плоскирева+Е.с.+NaCl	221	111	50	157

Таким образом, была выявлена динамика в изменениях показателей светосуммы свечения исследуемых сред. Было обнаружено увеличение показателей светосуммы хемилюминесценции на 1, 7, 14, и 21 сутки в средах: Endo, BTN, Плоскирева.

Также, нами были выявлены 2 группы сред с разными показателями светосуммы хемилюминесценции после культивирования бактерий. В первой группе при добавлении *E. coli* возрастали показатели ХЛ, в эту группу вошли среды (Endo, БТН, XLD). Однако в среде Левина при добавлении *E. coli* показатели ХЛ снижались.

Добавление водного раствора NaCl для создания окислительного стресса в среды с культивированным в них микроорганизмом *E. coli* не привело к значительным изменениям показателей хемилюминесценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выполнении данной выпускной квалификационной работы были изучены теоретические основы темы исследования - метод хемилюминесценции, микробиологические методы, подобраны питательные среды, материалы для исследования, а также проанализированы научные публикации по теме работы, осуществлялся подбор современных в том числе иностранных источников для обзора литературы.

В данной работе была предпринята попытка оценить влияние условий культивирования микроорганизмов на хемилюминесценцию питательных сред, которая отражает процессы свободно-радикального окисления. Свободно-радикальное окисление, протекающее с образованием высокореакционных соединений - свободных радикалов (СР), в первую очередь активных форм кислорода (АФК), является жизненно-важным процессом. Содержание свободных радикалов в окружающей среде способно влиять на процессы роста и развития самих микроорганизмов. Известно, что продукты окисления тормозят клеточное деление, в то время как, повышение антиоксидантной активности стимулирует размножение клеток.

Необходимость проведения подобного исследования обуславливалось следующими задачами:

1. Оценить характер действия различных питательных сред и сред, с культивируемым в них микроорганизмом на образование радикалов кислорода;
2. Изучить изменения хемилюминесценции в динамике питательных сред на генерацию активных форм кислорода;
3. Оценить характер действия стресс-фактора, при добавлении его в питательные среды, на параметры хемилюминесценции.

Таким образом, качественно-количественный состав среды, время инкубации и действие стресс-фактора являлись условиями, влияние которых оценивалось на показатели хемилюминесценции.

В модельной системе образование АФК инициировали добавлением железа. Об интенсивности образования радикалов судили по сопровождающей процессу окисления хемилюминесценции. При добавлении исследуемых образцов в модельные системы интенсивность хемилюминесценции менялась, что отражало их влияние на процессы образования активных форм кислорода.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что условия культивирования приводят к сдвигам параметров хемилюминесценции.

Культуральные среды и среды с культивируемым в них МО, влияют на процессы свободно-радикального окисления. Среды, широко используемые для культивирования микроорганизмов, по-разному влияют на интенсивность хемилюминесценции в модельной системе, генерирующей радикалы кислорода. Полученные данные могут быть использованы при конструировании новых питательных сред для направленного изменения процессов свободно-радикального окисления, что может сказаться на интенсивности размножения микроорганизмов.

По результатам нашей работы выбранный в качестве фактора стресса водный раствор NaCl не вызвал никаких достоверных изменений. Исследование показало, что в течение времени изменяются показатели хемилюминесценции питательных сред и сред с культивируемыми в них микроорганизмом. Таким образом, качественно-количественный состав питательных средств и время как условия культивирования приводят к изменению хемилюминесценции.

Проведенные исследования создают предпосылки для практического применения разработанных в данной работе методик, а именно изменения показателей свечения позволяют оценить условия культивирования микроорганизмов с их последующей коррекцией. Полученные данные дают возможность разработать экспресс-методы оценки функциональной активности

микроорганизмов и параметров среды, в которой происходит их рост и развитие.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена динамика в изменениях показателей светосуммы свечения исследуемых сред. Было обнаружено увеличение показателей светосуммы хемилюминесценции на 1, 7, 14, и 21 сутки в средах: Endo, BTN, Плоскирева.
2. Нами были выявлены 2 группы сред с разными показателями светосуммы хемилюминесценции после культивирования бактерий. В первой группе при добавлении *E. coli* возрастали показатели ХЛ, в эту группу вошли среды (Endo, БТН, ХЛД). Однако в среде Левина при добавлении *E. coli* показатели ХЛ снижались.
3. Добавление раствора NaCl для создания окислительного стресса в среды с культивированным в них микроорганизмом *E. coli* не привело к значительным изменениям показателей хемилюминесценции.
4. Применение хемилюминесцентного метода может быть предложено для изучения условий культивирования микроорганизмов, оценке их функционально-метаболической активности микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антропов, А.П. Физико-химическое исследование хемилюминесцентной реакции люминола в организованных молекулярных системах / А.П. Антропов, А.В. Рагуткин, Т.В. Янькова, Н.К. Зайцев // Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения. 2017. Т. 17. № 3. С. 738-741.
2. Асташкина, А.П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов / А.П. Асташкина // Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.
3. Ахова, А.В. Формирование сопутствующего окислительного стресса в клетках *Escherichia coli*, подвергнутых действию различных экологических стрессоров / А.В. Ахова П.А. Секацкая, А.Г. Ткаченко // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 6. С. 535-541.
4. Барсукова, М. Е. Основные методы и подходы к определению маркеров окислительного стресса – органических пероксидных соединений и пероксида водорода / М. Е. Барсукова, Ю. И. А. Веселова, Т. Н. Шеховцова // Журнал аналитической химии. 2019. Т. 74. № 5. С. 335-349.
5. Бельская, Л.В. Оценка уровня окислительного стресса по изменению кинетики хемилюминесценции слюны / Л. В. Бельская, Е.А. Сарф // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2018. Т. 3. № 4. С. 847-852.
6. Бричагина, А.С. Метод хемилюминесценции в изучении процессов липопероксидации при артериальной гипертензии и стрессе / А.С. Бричагина, М.И. Долгих, Л.Р. Колесникова, Л.В. Натяганова // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). 2019. Т. 4. № 1. С. 133-137.
7. Бурова, Л. Г. Изучение антибактериальной активности производных изоалантолактона в отношении *Escherichia coli* / Л. Г. Бурова, И. В. Широких, С. С. Патрушев, Э. Э. Шульц // Научные конференции НГМУ. 2017. № 1. С. 10-13.
8. Бухарин, О.В. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова, Г. И. Эль-Регистан // Москва, 2005.

9. Владимиров, Г. К. Хемилюминесцентная методика определения общей антиоксидантной емкости в лекарственном растительном сырье / Г. К. Владимиров, Е. В. Сергунова, Д. Ю. Измайлов, Ю. А. Владимиров // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2016. № 2. С. 65-72.

10. Волкова, П.О. Определение гидропероксидов липидов методом активированной хемилюминесценции / П.О. Волкова, А.В. Алексеев, А.А. Джагдоева, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2016. Т. 57. № 1. С. 41-52.

11. Вяткин, А.В. Напитки антиоксидантной направленности как метод борьбы с окислительным стрессом / А.В. Вяткин, О.В. Чугунова // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. Т. 6. № 4 (19). С. 119-126.

12. Домотенко, Л.В. Этапы развития производства питательных сред в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии / Л.В. Домотенко, О.В. Полосенко, А.П. Шепелин // Бактериология. 2019. Т. 4. № 4. С. 61-67.

13. Егорова, И.Ю. Микробиологические питательные среды нового формата в ветеринарно-санитарной оценке продуктов питания и сырья животного происхождения / И.Ю. Егорова, В.Е. Никитченко, Д.В. Никитченко, А.Н. Чернышева, Е.О. Рысцова // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2017. Т. 12. № 1. С. 76-85.

14. Еропкин, М. Ю. Культура клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов / М.Ю. Еропкина, Е. М. Еропкина. - СПб.: МОРСАР, 2003. – 240 с.

15. Завадский, С.П. Физико-химические методы изучения антиоксидантной активности растительного сырья и продуктов его переработки / И.И. Краснюк, Ю.Я. Харитонов, В.В. Тарасов, А.Н. Кузьменко, Д.А. Козин, Н.Б. Саидов, О.В. Ольшанская, А.А. Евграфов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2 (19). С. 214-221.

16. Закотеев, Ю. А. Хемилюминесценция. Принципы и методики регистрации, оборудование, задачи / Ю. А. Закотеев // Москва 2015 г.

17. Зенков, Н.К. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе / Н.К. Зенков, А.В. Чечушков, П.М. Кожин, Г.Г. Мартинович, Н.В. Кандалинцева, Е.Б. Меньщикова // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18. № 2. С. 195-214.

18. Ибрагимова, Д.А. Влияние поверхностно-активных веществ на хемилюминесцентную реакцию люминол–пероксид водорода / Д.А. Ибрагимова, О.М. Камиль, Т.В. Янькова, Н.А. Яштулов, Н.К. Зайцев // Тонкие химические технологии. 2017. Т. 12. № 6. С. 71-76.

19. Камиль, О. М. Обзор влияние условий процесса на хемилюминесценции (хл) в ходе химической реакции люминола - перекисью водорода в присутствии катализатора / О. М. Камиль // Аллея науки. 2017. № 7. С. 207-220.

20. Карпенко, Е. А. Анализ про- и антиоксидантной систем в плазме крови больных аденомой и раком простаты / Е. А. Карпенко // Красноярск : СФУ, 2019.

21. Кичерова, О. А. Вред и польза окислительного стресса / О. А. Кичерова, Л. И. Рейхерт, К. П. Кичерова // Медицинская наука и образование Урала. 2019. Т. 20. № 4 (100). С. 193-196.

22. Колтовой, Н. А. Книга 4. Часть 1. Хемилюминесценция / Колтовой Н. А. // Москва. 2017. 145с.

23. Кулыгин, Д.А. Разновидности люминесценции / Д.А. Кулыгин // Инновационная наука. 2016. № 12-4. С. 36-38.

24. Куликова, Н.А. Влияние антибиотиков на формирование окислительного стресса бактерий / Н.А. Куликова // Международный студенческий научный вестник. 2017. № 4-5. С. 614-615.

25. Кустова, И. А. Разработка технологии новых пищевых продуктов с использованием экстрактов из вторичного виноградного сырья / И. А. Кустова // автореферат дис. кандидата технических наук / Сев.-Кавказ. зон. науч.-исслед. ин-т садоводства и виноградарства. Краснодар, 2016

26. Лаврский, А.Ю. Влияние микроволнового излучения различных частот на рост культур *Escherichia coli* / А.Ю. Лаврский, Н.Ю. Калугина // Вестник Пермского государственного гуманитарно-педагогического университета. Серия № 2. Физико-математические и естественные науки. 2020. № 1. С. 36-44.

27. Литусов, Н.В. Эшерихии / Н.В. Литусов // Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2016. - 36 с.

28. Лудан, В.В Роль антиоксидантов в жизнедеятельности организма / В.В. Лудан Л. В. Польская // Таврический медико-биологический вестник. 2019. Т. 22. № 3. С. 86-92

29. Лысенко, В.И. Оксидативный стресс как неспецифический фактор патогенеза органных повреждений (обзор литературы и собственных исследований) / В.И. Лысенко // Медицина неотложных состояний. 2020. Т. 16. № 1. С. 24-35.

30. Мелихова, Л.А. Теоретические основы определения уровня токсичности свободных радикалов с использованием люминесцирующих бактериальных клеток / Л.А. Мелихова Ю.В. Миндолина // Международный студенческий научный вестник. 2017. № 4-3. С. 269-270.

31. Небесная, Е.Ю. Влияние окислительного стресса на регуляцию сосудистого тонуса / Е.Ю. Небесная // Международный студенческий научный вестник. 2017. № 6. С. 165.

32. Николаев, А.А. Свободные радикалы и биоантиоксиданты в репродуктивных процессах (обзор литературы) / А.А. Николаев, П.В. Логинов, Е.Б. Мавлютова, А.А. Белявская // Проблемы репродукции. 2018. Т. 24. № 1. С. 21-26.

33. Павлов, В.Н. Свободнорадикальное окисление и канцерогенез: дискуссионные вопросы/В.Н. Павлов, И.Р. Рахматуллина, Р.Р. Фархутдинов, В.А. Пушкарев, К.В. Данилко, Э.Ф. Галимова, Ю.Л. Баймурзина, И.В. Петрова, К.С. Мочалов// Креативная хирургия и онкология. 2017. Т. 7. № 2. - с. 54-61.

34. Павлов, В.Н. Сравнительный анализ антиоксидантных эффектов ко-энзима q и l-карнитина у мужчин с идиопатической патоспермией / В.Н. Павлов, Э.Ф. Галимова, В.А. Катаев, Р.Р. Фархутдинов, К.С. Мочалов, Ю.Л. Баймурзина, Ш.Н. Галимов // Медицинский вестник Башкортостана. 2013. Т. 8. № 6. - С. 161-163.

35. Панкратова, Н.А. Исследование процесса культивирования *E. coli* в реакторе периодического действия / Н.А. Панкратова Д.А. Табакова, Е.В. Гусева // Успехи в химии и химической технологии. 2017. Т. 31. № 9 (190). С. 32-33.

36. Петерса, М. А. Изменение экспрессии антиоксидантных генов при росте *Escherichia coli* на различных источниках углерода и энергии / М. А. Петерс, Н. Г. Музыка, А. В. Тюленев, О. Н. Октябрьский, Г. В. Смирнова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. 2016. № 4. С. 356-361.

37. Пельтек, С.Е. Стрессовые системы *Escherichia coli* и их роль в реакциях на воздействие терагерцового излучения / С.Е. Пельтек, Е.В. Демидова, В.М. Попик, Т.Н. Горячковская // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 6. С. 876-886.

38. Пискарев, И. М. Инициирование и исследование свободно-радикальных процессов в биологических экспериментах / И. М. Пискарев, И. П. Иванова, А. Г. Самоделкин, М. Н. Иващенко // — Н. Новгород: ФГБОУ ВО Нижегородская ГСХА, 2016. — 140 с.

39. Постникова, Л.Б. Оксидативный стресс, индуцированный антибактериальными препаратами, и антибиотикорезистентность бактерий / Л.Б. Постникова, С.К. Соодаева, И.А. Климанов, Н.И. Кубышева, К.И. Афиногенов, М.В. Глухова, Л.Ю. Никитина // Пульмонология. 2017. Т. 27. № 5. С. 664-671.

40. Проскурнина, Е.В. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов / Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // Сборник: Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии. Под редакцией А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова

41. Романцева, Ю.Н. Усовершенствование питательных сред с использованием пантолизата / Ю.Н. Романцева // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2018. № 7 (165). С. 127-132.

42. Рекша, В. Э. Антиоксиданты и свободные радикалы / В. Э. Рекша // В сборнике: ДЕКАДА ЭКОЛОГИИ. материалы XI Международного конкурса. 2017. С. 126-129.

43. Скоморина, Ю.А. Сравнительная оценка дифференциальнодиагностических сред для выделения *Escherichia coli* с целью применения в ветеринарных лабораториях / Ю.А. Скоморина, А.А. Кремлева, Л.Ш. Ахметова, Т.А. Подольская, А.П. Шепелин, О.В. Полосенко // Бактериология. 2020. Т. 5. № 2. С. 24-32.

44. Ситникова, О. Г. Исследование хемилюминесценции сыворотки крови в присутствии нанокompозита полистирол/бентонит/ магнетит in vitro / О. Г. Ситникова, О. В. Алексеева, М. М. Клычева, А. Н. Родионова, С. Б. Назаров, А. В. Агафонов // Таврический медико-биологический вестник. 2018. Т. 21. № 2-1. С. 83-87.

45. Сутормина, Л.В. Исследование бактериостатической и антиоксидантной активности экстракта левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum cathamoides*) в растущих культурах *Escherichia coli* / Л.В. Сутормина, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // Химия. Экология. Урбанистика. 2020. Т. 2020-2. С. 191-195.

46. Сулейманова, А.Д. Роль минеральных веществ в регуляции процессов свободно-радикального окисления в организме / А.Д. Сулейманова, Е.Н. Любина // Actualscience. 2016. Т. 2. № 1. С. 7-8.

47. Ситникова, О. Г. Исследование общей антиокислительной активности пуповинной крови и лизата клеток сосудов пуповины новорожденных методом хемилюминесценции / О. Г. Ситникова, И. Г. Попова, С. Б. Назаров, Г. Н. Кузьменко, М. М. Клычева // Таврический медико-биологический вестник. 2017. Т. 20. № 2-2. С. 151-153.

48. Тарасенко, Е.А. Определение свободно-радикальной активности твердых веществ с помощью системы химических реагентов / Е.А. Тарасенко, Е.А. Гудкова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2016. № 18 (239). С. 104-107.

49. Теселкин, Ю.О. Модифицированный хемилюминесцентный метод определения антиоксидантной способности биологических жидкостей и тканей / Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, А.Н. Осипов // Биофизика. 2019. Т. 64. № 5. С. 883-892.

50. Фархутдинов, Р.Р. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминометре ХЛ-003/Р.Р. Фархутдинов, С.И. Тевдорадзе // Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ. М., РУДН. 2005. - с.147-154.

51. Фархутдинов, Р.Р. Влияние питательных сред на процессы свободнорадикального окисления/Р.Р. Фархутдинов, И.В. Петрова, К.С. Мочалов, Д.Р. Гизатуллина, К.О. Эксакустиди, А.А. Алимгулова//Биорадикалы и антиоксиданты. 2016. Т. 3. № 4. - с. 18-21.

52. Фархутдинов, Р.Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в медицине / Р.Р. Фархутдинов, В.А. Лиховских // Уфа 1995, 90 с.

53. Фурман, Ю. В. Окислительный стресс и антиоксиданты / Ю. В. Фурман, Е. Б. Артюшкова, А. В. Аниканов // Актуальные проблемы социально-гуманитарного и научно-технического знания. 2019. № 1 (17). С. 1-3.

54. Ходос, М.Я. Мониторинг окислительного стресса в биологических объектах / М.Я. Ходос, Я.Е. Казаков, М.Б. Видревич, Х.З. Брайнина // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2017. Т. 14. № 3. С. 262-274.

55. Ходос, М.Я. Окислительный стресс и его роль в патогенезе / М.Я. Ходос, Я.Е. Казаков, М.Б. Видревич, Х.З. Брайнина // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2017. Т. 14. № 4. С. 381-398.

56. Шаповалов, Ю.А. Радикалы в структурах клетки / Ю.А. Шаповалов, П.П. Гладышев, С.Т. Тулеуханов, Е.В. Швецова, Ж.Т. Абдрасулова // Биофизика. 2020. Т. 65. № 4. С. 691-704.

57. Шичкова, Ю.С. Роль путей клеточной сигнализации в развитии последствий окислительного стресса / Ю.С. Шичкова // Научный электронный журнал Меридиан. 2020. № 3 (37). С. 6-8.

58. Шлапакова, Т. И. Активные формы кислорода: участие в клеточных процессах и развитии патологии / Т. И. Шлапакова, Р. К. Костин, Е. Е. Тягунова // Биоорганическая химия. 2020. Т. 46. № 5. С. 466-485.

ПРИЛОЖЕНИЕ
ИЗУЧЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕКОТОРЫХ СРЕД
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Садыков Эльмир Марсельевич

Студент

Чуваткина Анна Кирилловна

Магистрант

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Научные руководители: Мавзютов Айрат Радикович

д.м.н., профессор,

Борцова Юлия Львовна

к.б.н., доцент

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Аннотация: в статье описаны результаты исследований изменения антиоксидантных свойств некоторых питательных сред в модельной системе в которой протекают процессы свободно-радикального окисления. Изучение влияния сред, используемых для культивирования микроорганизмов, на процессы пероксидации является важным критерием для характеристики особенностей микробиологических средств.

Ключевые слова: хемилюминесценция, антиоксиданты, свободно-радикальное окисление, питательные среды.

STUDY OF CHEMILUMINESCENCE OF SOME MICROBIAL CULTURE MEDIA

Sadykov Elmir Marselevich

Chuvatkina Anna Kirillovna

Scientific adviser: Mavzyutov Airat Radikovich,

Borcova Julia Lvovna

Abstract: *the article describes the results of studies of changes in the antioxidant properties of some nutrient media in a model system of free radical oxidation processes. The study of the influence of the media used for the cultivation of microorganisms on the peroxidation processes is an important criterion for characterizing of microbiological agents.*

Key words: *chemiluminescence, antioxidants, free radical oxidation, nutrient media.*

Актуальность. Питательные среды в микробиологии — это субстраты, которые применяются для выделения и изучения чистых культур микроорганизмов и для других биологических, медицинских целей [1, с.10]. При культивировании, важнейшие элементы питания и факторы роста поступают в бактериальную клетку в составе питательных сред, которая не является стабильной, а это в свою очередь, оказывает влияние на виталитет микроорганизмов. Хорошо известно, что истощение элементов питания, влияние оксидантов (свободных радикалов), а также любое изменение условий культивирования выступают естественными ограничивающими факторами роста и развития микроорганизмов [3, с. 18]. Поскольку параметры питательных сред не стабильны, то они могут рассматриваться в качестве индикатора функционально-метаболического состояния бактериальной клетки [1, с.15]. Одним из параметров определения состояния среды культивирования микроорганизмов является их антиокислительная активность — способность противодействовать образованию свободных радикалов, определяемых с помощью метода хемилюминесценции [2, с. 148, 4, с. 64, 5, с. 161].

Цель исследования: изучить хемилюминесценцию некоторых сред культивирования микроорганизмов в модельной системе генерации активных форм кислорода.

Материалы и методы.

Влияние некоторых микробиологических сред, используемых для культивирования микроорганизмов, клеток и тканей, было исследовано на процессы свободно-радикального окисления (СРО) в модельной системе ге-

нерации активных форм кислорода (АФК). В работе нами были исследованы следующие среды культивирования микроорганизмов:

1. БТН-агар - плотная питательная среда (питательный агар для культивирования микроорганизмов), предназначена для культивирования микроорганизмов широкого спектра;

2. Агар Эндо — дифференциально-диагностическая питательная среда, предназначенная для выделения энтеробактерий;

3. ГРМ- бульон "питательный бульон для культивирования микроорганизмов";

4. XLD-агар – (ксилозо-лизин-дезоксихолатная агаровая среда) - для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий, в частности, сальмонелл и шигелл при проведении бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии.

Питательные среды добавляли в модельную систему АФК и по изменению сопровождающей процессы окисления хемилюминесценции (ХЛ) судили об интенсивности образования свободных радикалов. Модельная система, для регистрации хемилюминесценции среды культивирования микроорганизмов состоит из фосфатного буфера (20 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl , pH = 7,5) с цитратом натрия (50 мМ) и люминола (10-5М). Процесс свечения инициировался 1 мл раствора сернокислого железа (50мМ). Судить о антиоксидантной активности микробиологических сред можно по изменению показателей ХЛ –светосуммы свечения при добавлении в модельную систему.

В результате проделанной работы была выявлена динамика в изменениях показателей хемилюминесценции исследуемых микробиологических сред. На первые сутки культивирования было отмечено увеличение светосуммы ХЛ в среде XLD-агар, а на 7-е и последующие сутки в данной среде было отмечено снижение показателей процессов пероксидации. В следующих микробиологических средах: БТН-агар, ГРМ-бульон, Агар Эндо было отмечено увеличение показателей светосуммы хемилюминесценции в исследуемый период времени (таблица 1).

Таблица 1

Изменение параметров светосуммы хемилюминесценции сред при их добавлении в модельную систему, генерирующей активные формы кислорода в динамике (контроль принят за 100%)

Среда культивирования	1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Контроль	100	100	100	100
XLD-агар	160	73	30	70
БТН-агар	150	385	290	364
ГРМ- бульон	320	400	290	384
Агар Эндо	170	209	186	240

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что внесение в модельную систему АФК сред культивирования микроорганизмов приводит к изменению окислительного потенциала питательных сред, изменения в них свободно радикальных процессов, что и приводит к регистрируемым параметрам хемилюминесценции. Изучение влияния микробиологических сред на процессы СРО может помочь рекомендовать среды для культивирования различных микроорганизмов, клеток и тканей, а также для изучения особенностей состава микробиологических средств и подбора для индивидуального культивирования.

Список литературы

1. Еропкин, М. Ю. Культура клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов/М.Ю. Еропкина, Е. М. Еропкина. - СПб.: МОРСАР, 2003. – 240 с.
2. Фархутдинов, Р.Р. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминомере ХЛ-003/Р.Р. Фархутдинов, С.И. Тевдорадзе // Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ. М., РУДН. 2005. - с.147-154.
3. Фархутдинов, Р.Р. Влияние питательных сред на процессы свободно-радикального окисления/Р.Р. Фархутдинов, И.В. Петрова, К.С. Мочалов, Д.Р. Гизатуллина, К.О. Эксакустиди, А.А. Алимгулова//Биорадикалы и антиоксиданты. 2016. Т. 3. № 4. - с. 18-21.
4. Павлов, В.Н. Свободнорадикальное окисление и канцерогенез: дискуссионные вопросы/В.Н. Павлов, И.Р. Рахматуллина, Р.Р. Фархутдинов, В.А. Пушкарев, К.В. Данилко, Э.Ф. Галимова, Ю.Л. Баймурзина, И.В. Петрова, К.С. Мочалов// Креативная хирургия и онкология. 2017. Т. 7. № 2. - с. 54-61.
5. Павлов, В.Н. Сравнительный анализ антиоксидантных эффектов коэнзима q и l-карнитина у мужчин с идиопатической патоспермией / В.Н. Павлов, Э.Ф. Галимова, В.А. Катаев, Р.Р. Фархутдинов, К.С. Мочалов, Ю.Л. Баймурзина, Ш.Н. Галимов // Медицинский вестник Башкортостана. 2013. Т. 8. № 6. - С. 161-163.

Сертификат

Садыков Ильмир Фарселевич

принял(а) участие в работе школы-семинара

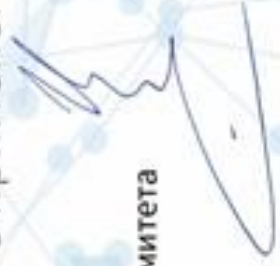
HTSDD-2020

High throughput screening in drug discovery

состоявшейся онлайн 1-2 декабря 2020 г.

в рамках Государственного контракта РНФ "Новый рациональный подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых лекарственных молекул с применением технологий ВПС"

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич





СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Башкирский государственный медицинский
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Садыков Эльмир Марсельевич
Самоцитирование
рассчитано для: Садыков Эльмир Марсельевич
Название работы: ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

ЗАИМСТВОВАНИЯ	14.93%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	14.94%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	60.54%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	84.15%
ЦИТИРОВАНИЯ	24.52%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.92%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 23.06.2021 14:26

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 23.06.2021

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

*Справка выдана с учетом системы модуля
библиографических записей.*

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

23.06.2021



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.

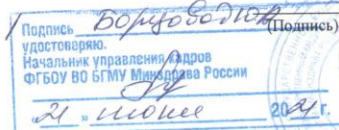
ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401А
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Садыкова Эльмира Марсельевича
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Влияние условий культивирования бактерий на хемилюминесценцию

- 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 ведётся поиск методов для изучения функционально-метаболической активности микроорганизмов
- 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 Excel, Microsoft PowerPoint
- 5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. Выпускник показал отличное умение использовать, научную, в том числе иностранную литературу
- 6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР. График выполнения проекта соблюдался
- 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, предъявляемые к выполнению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР) студентов выпускных курсов
- 8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости). Работа выполнена в соответствии с требованиями. По материалам работы выполнены 2 публикации, которые находятся в печати
(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 изучена, заслуживают внимания результаты и выводы
- 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 Результаты работы могут быть в дальнейшем использованы для научно-исследовательской деятельности и в учебном процессе.
- 11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично и рекомендована к защите.

Руководитель выпускной квалификационной работы:
к.б.н, доцент кафедры ФПМ
Борцова Ю.Л.



Ведущий специалист
Управления кадров
Самигуллина А.Р.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Садыкова Эльмира Марсельевича

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Влияние условий культивирования бактерий на хемилюминесценцию»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема работы является актуальной. Методы и способы решения адекватны и реализованы

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. Выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике. Тема работы раскрыта в соответствии с поставленными задачами данного исследования

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе. Результаты работы имеют важное значение для социально-экономического развития в приоритетных областях микробиологической науки

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств. Работа выполнена с использованием современных приборных средств и компьютерной технологии. Освоены методы регистрации и анализа параметров хемилюминесценции

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Две публикации по теме выпускной квалификационной работы находятся в печати

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. В период выполнения ВКР Садыков Э.М. ответственно относился к выполнению заданий, проявлял активный интерес к теме работы, показал отличный уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений

Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и выводы, подтверждающие достоверность исследований

10 Замечания по усмотрению рецензента Замечаний нет

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для научных исследований

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично» и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр.

Рецензент

ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по
научно-производственной работе,
профессор, д.б.н.
(Место работы, занимаемая должность)



А.П. Шепелин

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Садыкова Эльмира Марсельевича

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Влияние условий культивирования бактерий на хемилюминесценцию»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема работы является актуальной. Методы и способы решения адекватны и реализованы

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. Выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике. Тема работы раскрыта в соответствии с поставленными задачами данного исследования

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе.

Результаты работы имеют важное значение для социально-экономического развития в приоритетных областях микробиологической науки

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств.

Работа выполнена с использованием современных приборных средств и компьютерной технологии.

Освоены методы регистрации и анализа параметров хемилюминесценции

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Две публикации по теме выпускной квалификационной работы находятся в печати

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. В период выполнения ВКР Садыков Э.М. ответственно относился к выполнению заданий, проявлял активный интерес к теме работы, показал отличный уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.

Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений

Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и выводы, подтверждающие достоверность исследований

10 Замечания по усмотрению рецензента Замечаний нет

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.

Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для научных исследований

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично» и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр.

Рецензент

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
Заведующий ЦНИЛ, к.б.н.

(Место работы, занимаемая должность)

Подпись Самигуллина А.Р.
удостоверяю.
Начальник управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
21.10.2021

Ведущий специалист
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
САМИГУЛЛИНА А.Р.

К.С. Мочалов