

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.22

**Роль вторичного окислительного стресса  
в бактерицидном действии антибиотиков****А.В. Ахова\* , А.Г. Ткаченко **

*Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный исследовательский центр, УрО РАН,  
Россия, 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13  
\*e-mail: akhovan@mail.ru*

Воздействие  $\beta$ -лактамов, фторхинолоновых и аминогликозидных антибиотиков вызывало усиление продукции пероксида водорода и активацию экспрессии генов защиты от окислительного стресса (OxyR-регулон) по принципу доза-эффект в клетках *Escherichia coli*. В условиях микроаэрации ослабление интенсивности вторичного окислительного стресса, вызванного воздействием антибиотика, за счет добавки антиоксиданта тиомочевина оказывало влияние на антибактериальную активность фторхинолонов. Добавка антиоксиданта потенцировала сублетальное (не вызывавшее снижение количества колониеобразующих единиц ниже уровня  $10^3$ /мл) действие антибиотика и повышала выживаемость бактериальных клеток, подвергнутых действию летальных доз. В присутствии антиоксиданта экспрессия генов OxyR-регулона, активированная сублетальным воздействием антибиотика, снижалась до уровня нестрессированной культуры. В условиях воздействия летальных доз антибиотика при добавке тиомочевина также наблюдалось снижение экспрессии генов антиоксидантной защиты, однако повышенный по сравнению с контролем уровень экспрессии сохранялся. Это может свидетельствовать о двойственной роли активных форм кислорода в условиях воздействия антибиотиков как повреждающих агентов, вносящих вклад в гибель клеток, и как сигнальных молекул, активирующих защитные механизмы.

**Ключевые слова:** *активные формы кислорода, антибиотики, фторхинолоны, пероксид водорода, OxyR-регулон, каталаза*

Одной из проблем современной медицины является снижение эффективности антибиотикотерапии бактериальных инфекций, обусловленное резким ростом числа резистентных форм микроорганизмов. Для ее решения ведется поиск соединений, обладающих новыми механизмами антибактериального действия, и факторов, усиливающих противомикробную активность известных препаратов, а также изучение механизмов формирования антибиотикостойчивости с целью предотвращения появления резистентных форм.

Ранее продемонстрировано появление маркеров развития окислительного стресса, таких как повышение внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК), активация систем антиоксидантной защиты или окислительное повреждение макромолекул в бактериальных клетках, подвергнутых действию различных антибактериальных препаратов [1, 2]. В связи с проблемой роста антибиотикорезистентности потенциальная вовлеченность АФК в бактерицидное действие антибиотиков привлекает особое внимание и широко обсуждается в течение последнего десятилетия. Предполагается, что возможно усилить антибактериальный эффект известных препаратов за счет потенцирования внутриклеточной продукции

АФК или ослабления систем антиоксидантной защиты бактерий.

Началом активного обсуждения данного вопроса послужила работа Коллинза с соавторами, в которой продемонстрировано увеличение продукции АФК в бактериальных клетках, подвергнутых воздействию бактерицидных антибиотиков, включая фторхинолоны, аминогликозиды и  $\beta$ -лактамы. Ослабление сопутствующего окислительного стресса при добавке антиоксидантов приводило к повышению выживаемости бактерий [3]. Это позволило группе Коллинза предположить, что гибель бактерий в результате воздействия бактерицидных антибиотиков обусловлена, наряду со специфическим воздействием препаратов на мишень, общим механизмом, основанным на окислительном повреждении компонентов клеток.

Несмотря на большое количество работ, посвященных данной теме, роль АФК в бактерицидном действии антибиотиков, в особенности в естественных условиях существования микроорганизмов, до сих пор остается предметом для дискуссии [4–6]. Принимая во внимание ограничения, присущие каждому из использованных в данных исследованиях методов, включая сравнительную оценку жизнеспособности бактерий

в аэробных и анаэробных условиях, при добавке химических антиоксидантов и в условиях наличия/отсутствия/сверхэкспрессии антиоксидантных генов [3, 7–9] можно сделать вывод о вовлеченности АФК в гибель клеток под действием антибиотиков, по крайней мере, в лабораторных условиях.

Как правило, вклад АФК в гибель бактерий под действием антибиотиков продемонстрирован на быстро растущих клетках, культивируемых в условиях высокой аэрации [3, 8, 9], в то время как для естественных мест обитания скорее характерны условия микроаэрации и медленный рост. Активация систем антиоксидантной защиты в условиях микроаэрации в ответ на воздействие антибиотиков [10], а также повышение в их присутствии уровня АФК в клетках из биопленки [11] позволяют предположить, что общий механизм окислительного повреждения может быть вовлечен в бактерицидное действие антибиотиков и в этих условиях.

В тоже время показано, что эндогенный окислительный стресс способствует формированию генетического разнообразия клеток в составе биопленки, что может расширять адаптивные возможности бактериальной популяции под действием антибиотиков [12]. Сходный вариант развития событий наблюдался при сублетальном воздействии антибиотиков [13]. Помимо мутагенного эффекта, АФК, активируя системы адаптивных ответов, могут выполнять также сигнальную функцию. У *Escherichia coli* основная часть антиоксидантных генов объединена в два регулона: SoxRS-регулон, экспрессия которого индуцируется в ответ на высокий уровень супероксидных анионов и воздействие редокс-циклирующих соединений, и OxyR-регулон, активирующийся в ответ на повышение концентрации пероксида водорода [14].

В качестве одного из доказательств вовлеченности АФК в бактерицидное действие антибиотиков в естественных условиях приводят факт повышения базового уровня экспрессии генов SoxRS-регулона у некоторых клинических изолятов энтеробактерий, резистентных к фторхинолонам [15]. Однако в данном случае, наряду с активностью антиоксидантных ферментов, свой вклад могут вносить механизмы ограничения транспорта антибиотиков в клетку и работа помп множественного лекарственного выброса, также находящиеся под контролем данного регулона. Кроме того, было обнаружено, что клинические изоляты *Acinetobacter baumannii*, характеризующиеся множественной лекарственной устойчивостью, проявляют повышенную активность каталазы, ответственной за разложение пероксида водорода [16].

Таким образом, роль АФК в бактерицидном действии антибиотиков не столь однозначна и зависит от условий, дозы препарата и состояния объекта.

В данной работе исследованы уровень продукции пероксида водорода и интенсивность экспрессии генов, входящих в OxyR-регулон, а также дана оценка вклада АФК в гибель клеток *E. coli*, подвергнутых действию  $\beta$ -лактамных, фторхинолоновых и аминогликозидных антибиотиков в условиях микроаэрации.

## Материалы и методы

### Микроорганизмы и условия культивирования.

В качестве объектов использованы штаммы *E. coli* BGF931 (MC4100  $\lambda$  katG<sup>+</sup>::lacZ) и BGF940 (MC4100  $\lambda$  oxyR<sup>+</sup>::lacZ), любезно предоставленные профессором Б. Демплом [17].

Клетки *E. coli*, сохраняемые на скошенном агаре LB («Sigma», США), переносили в пробирки с 5 мл бульона LB («Amresco», США) и культивировали 4–6 ч при 37°C без перемешивания. Затем бактериальные клетки переносили в соотношении 1:1000 в колбы Эрленмейера, содержащие 50 мл среды M9 с добавкой 0,4% глюкозы, и культивировали при 37°C с перемешиванием при 100 об./мин (термостатируемый шейкер 1092 («GFL», Германия)) в течение 14–16 ч. Ночную культуру разводили в свежей среде до оптической плотности  $A_{600}=0,1$  и культивировали в описанных выше условиях. Исследуемые антибиотики добавляли по достижении культурой оптической плотности  $A_{600}=0,3$  (рис. 1, 2).

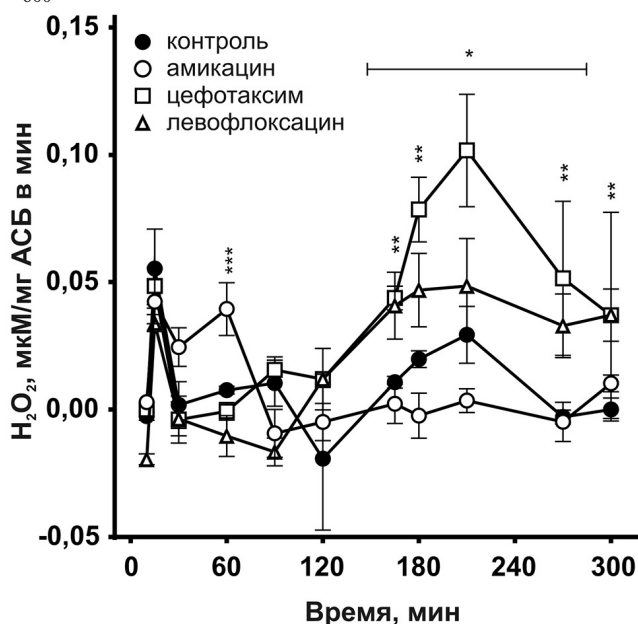


Рис. 1. Влияние антибиотиков на продукцию пероксида водорода клетками *E. coli* BGF931. Бактериальные клетки культивировали в отсутствие антибиотиков (контроль) и в присутствии 15 мкг/мл амикацина, 0,02 мкг/мл левофлоксацина или 3 мкг/мл цефотаксима. Данные представлены в формате  $\text{среднее} \pm \text{ошибка среднего}$ . АСБ — абсолютная сухая биомасса. \* — статистически значимое отличие культуры с добавкой цефотаксима от контроля; \*\* — статистически значимое отличие культуры с добавкой левофлоксацина от контроля; \*\*\* — статистически значимое отличие культуры с добавкой амикацина от контроля (t-критерий,  $p < 0,05$ ).

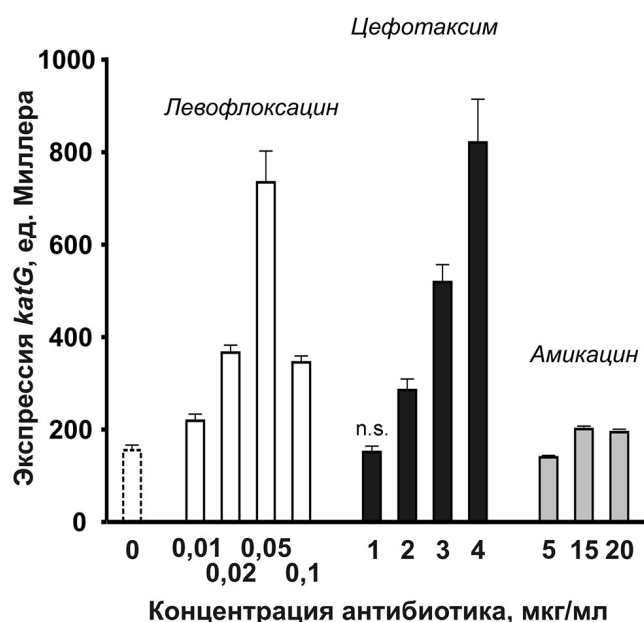


Рис. 2. Влияние антибиотиков на экспрессию гена *katG* в клетках *E. coli* BGF931. Уровень экспрессии определен на 4-й ч после внесения антибиотиков. Данные представлены в формате среднее  $\pm$  ошибка среднего. n.s. – отсутствие статистически значимого отличия от контроля (t-критерий,  $p < 0,05$ ).

В экспериментах по изучению влияния тиомочевины («Sigma», США) ночную культуру разводили в свежей среде М9 с добавкой 0,4 % глюкозы (50 мл) до оптической плотности  $A_{600} = 0,1$  и культивировали без перемешивания до достижения культурой  $A_{600} = 0,3$ . Затем равные объемы культуры переносили в пробирки, содержащие тиомочевину/воду, в которые после 10 мин инкубации добавляли исследуемые антибиотики (конечный объем 5 мл). Пробирки инкубировали при 37°C без перемешивания (таблица).

Оптическую плотность бактериальных культур ( $A_{600}$ ) измеряли по величине абсорбции при 600 нм с использованием спектрофотометра UV-1650PC («Shimadzu», Япония).

**Экспрессия генов.** Уровень экспрессии генов оценивали по активности  $\beta$ -галактозидазы в клетках, несущих слияние промотора исследуемого гена со структурной частью гена *lacZ*. Активность определяли в клетках, предварительно обработанных смесью додецилсульфата натрия и хлороформа, с добавкой орто-нитрофенил- $\beta$ -галактопиранозиды («Sigma», США) в качестве субстрата [18].

**Жизнеспособность бактерий.** Готовили несколько последовательных разведений бактериальной культуры в физрастворе и высевали по 10 мкл суспензии клеток на агар LB в чашках Петри. Чашки инкубировали при 37°C 16–18 ч, после чего производили подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ).

**Производство  $H_2O_2$  бактериальными клетками.** Для определения количества  $H_2O_2$  в среде культивирования использовали флуоресцентный краситель Amplex red («Invitrogen», США) в реакции с пероксидазой хрена («Sigma», США). 0,5 мл культуры центрифугировали при 16000g 2 мин и супернатант замораживали. Реакцию воспроизводили в соответствии с рекомендациями производителя. Флуоресценцию (530/590 нм) измеряли с использованием мультимодального планшетного ридера Infinity M200 («Tecan», Швейцария).

**Статистическая обработка результатов** проведена с использованием пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», США). Оценка статистической значимости различий средних сравниваемых групп произведена с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

Таблица

Влияние тиомочевины на экспрессию гена *oxyR* и восприимчивость *E. coli* к антибиотикам

Условия	lgКОЕ/мл [oxyR, ед. Миллера]								
	1			2			3		
	1 ч	4 ч	24 ч	1 ч	4 ч	24 ч	1 ч	4 ч	24 ч
Конт	8,00	8,34 [107]	8,49						
Конт +ТМ	8,00	8,17 [90]	8,39						
ЛФЦ	7,68	6,53 [186]	6,24	6,62	3,46 [270]	5,81	5,12	3,52 [632]	1,33
ЛФЦ +ТМ	7,49	5,90 [93]	6,20	6,95	4,02 [138]	<b>3,94</b>	4,97	3,98 [292]	<b>2,54</b>
ЦФТ	8,01	7,48 [217]	4,95	7,34	5,07 [1293]	2,04	6,98	3,96 [868]	0,7
ЦФТ +ТМ	7,84	7,17 [230]	3,63	7,36	4,82 [800]	1,44	7,48	4,21 [1109]	0
АМЦ	7,82	7,63 [86]	6,58	7,69	6,22 [80]	3,10	7,47	3,72 [69]	0
АМЦ +ТМ	7,70	7,28 [62]	5,81	7,51	5,38 [67]	3,44	7,28	3,96 [61]	0

Данные представлены в виде среднего, рассчитанного по совокупности результатов не менее трех отдельных экспериментов. Конт (контроль) – культура без добавки антибиотика; ЛФЦ – культура с добавкой 0,01 (1), 0,1 (2) и 0,3 (3) мкг/мл левофлоксацина; ЦФТ – добавка 0,5 (1), 2,0 (2) и 5,0 (3) мкг/мл цефотаксима; АМЦ – добавка 20 (1), 40 (2) и 60 (3) мкг/мл амикацина; +ТМ – добавка 50 мМ тиомочевины. Жирным шрифтом обозначены статистически значимые отличия от культуры без добавки тиомочевины (t-критерий,  $p < 0,05$ ).

## Результаты

**Воздействие антибиотиков вызывает повышение продукции пероксида водорода и уровня экспрессии гена *katG* в бактериальных клетках.** В культурах *E. coli*, подвергнутых сублетальному воздействию  $\beta$ -лактамов, фторхинолоновых и аминогликозидных антибиотиков, изучены маркеры развития окислительного стресса, включая экспрессию генов, входящих в OxyR-регулон, и количество пероксида водорода в среде культивирования. Как известно, действие  $\beta$ -лактамов (цефотаксим) направлено на процесс синтеза клеточной стенки, фторхинолонов (левофлоксацин) – на синтез и целостность ДНК, тогда как аминогликозиды (амикацин) ингибируют синтез белка. Кроме того, в качестве общего механизма антибактериального действия для всех трех групп антибиотиков рассматривается окисление компонентов бактериальной клетки в результате повышения продукции АФК [3]. Под сублетальными дозами антибиотиков (сублетальное воздействие) понимаются концентрации антибиотиков, воздействие которых на бактериальную культуру не приводило к гибели всех клеток (в частности, к снижению оптической плотности культуры по сравнению со стартовой точкой в момент добавки антибиотика и/или падению количества КОЕ ниже уровня  $10^3$ /мл). В последующих экспериментах также применялись ингибиторные дозы, под действием которых количество КОЕ в культуре сохранялось на том же уровне, что и в момент внесения антибиотика, и летальные – вызывавшие падение количества КОЕ ниже  $10^3$ /мл.

По мере увеличения плотности периодической культуры *E. coli* в отсутствие антибиотиков (контрольные условия) происходило накопление  $H_2O_2$  в среде культивирования, что сопровождалось повышением примерно на 15% уровня экспрессии гена *katG*, кодирующего каталазу, которая катализирует разложение пероксида водорода. Увеличение экспрессии *katG* регистрировалось после того, как концентрация  $H_2O_2$  в среде превышала 0,1 мкМ. Дальнейший рост концентрации  $H_2O_2$  (до 0,7 мкМ) не сопровождался увеличением экспрессии гена. С замедлением скорости роста культуры по мере приближения к переходу в стационарную фазу концентрация  $H_2O_2$  в среде стабилизировалась, а экспрессия *katG* снижалась до начального уровня. Увеличение концентрации  $H_2O_2$  в среде по мере роста культуры могло быть связано с увеличением плотности популяции, а не с увеличением продукции АФК в бактериальных клетках. Чтобы исключить этот момент при оценке образования АФК клетками под действием антибиотиков, была рассчитана скорость продукции  $H_2O_2$  с учетом показателей биомассы.

После 90 мин воздействия  $\beta$ -лактамов и фторхинолоновых антибиотиков количество

$H_2O_2$  в среде превысило 0,1 мкМ, в то время как в культуре, подвергнутой действию аминогликозида, этот предел не был перейден за все время наблюдения. Тем не менее, в первый час воздействия амикацина уровень продукции АФК был в 5–10 раз выше по сравнению с контролем (рис. 1). Значительное увеличение уровня продукции  $H_2O_2$  клетками, подвергнутыми воздействию  $\beta$ -лактама и фторхинолона, наблюдалось через 2 ч после внесения антибиотика (рис. 1).

Сублетальное воздействие фторхинолона левофлоксацина и  $\beta$ -лактама цефотаксима вызывало повышение экспрессии гена *katG* по принципу доза-эффект, хотя по достижении определенного порога наблюдалось снижение стимулирующего эффекта (рис. 2). Увеличение уровня экспрессии генов OxyR-регулона антиоксидантной защиты происходило как при культивировании в условиях более интенсивной аэрации (культивирование с перемешиванием) (рис. 2), так и в условиях микроаэрации (без перемешивания) (таблица). Сравнительно более низкие дозы амикацина (5 мкг/мл) вызывали понижение уровня экспрессии гена *katG* относительно контроля, а небольшое превышение контрольного уровня, наблюдаемое при воздействии более высоких концентраций, обусловлено, скорее, снижением генной экспрессии по мере роста культуры в отсутствие антибактериальных препаратов, чем увеличением экспрессии под действием антибиотика (рис. 2).

**Снижение интенсивности вторичного окислительного стресса за счет добавки антиоксиданта тиомочевины изменяет восприимчивость *E. coli* к фторхинолону.** Одним из подходов к оценке вовлеченности АФК в антибактериальное действие является сравнение чувствительности бактериальных клеток к антибиотику в присутствии и в отсутствие антиоксиданта. Поскольку данное исследование сфокусировано на пероксидном окислительном стрессе, в качестве антиоксиданта была выбрана тиомочевина, способная нейтрализовать  $H_2O_2$  [19]. Кроме того, именно тиомочевина применялась в предшествующих работах, посвященных выявлению роли АФК в бактерицидном действии антибиотиков [3, 4].

В предварительных экспериментах нами была подобрана концентрация тиомочевины, достаточная для нейтрализации летального действия экзогенного пероксида водорода (6 мМ), но не оказывающая влияния на скорость роста и количество КОЕ при культивировании в контрольных условиях. В условиях микроаэрации добавка тиомочевины изменяла восприимчивость *E. coli* к фторхинолонам, но не оказывала статистически значимого влияния на антибактериальное действие  $\beta$ -лактама и аминогликозида (таблица). Антиоксидант не оказывал влияния на ингибиторное действие фторхинолона, усиливал субле-

тальное воздействие и снижал эффект летальных доз антибиотика.

Наряду с влиянием на жизнеспособность бактериальных клеток, добавка тиомочевины оказывала влияние на уровень экспрессии генов защиты от окислительного стресса *OxyR*-регулона. Антиоксидантный эффект тиомочевины проявлялся в снижении экспрессии гена *oxyR*, активированной воздействием антибиотика (таблица).

### Обсуждение результатов

В данной работе показано, что в условиях аэрации средней интенсивности и микроаэрации в бактериальных клетках, подвергнутых действию антибиотиков, происходит усиление внутриклеточной продукции  $H_2O_2$ . В случае воздействия фторхинолона левофлоксацина и  $\beta$ -лактама цефотаксима повышенный уровень продукции пероксида водорода сохранялся на протяжении всего времени наблюдения и сопровождался активацией экспрессии генов, входящих в *OxyR*-регулон (рис. 1, 2). Полученные нами результаты отличаются от опубликованных ранее данных, свидетельствующих о том, что воздействие  $\beta$ -лактама ампициллина и фторхинолона норфлоксацина не вызывает накопление  $H_2O_2$  в количестве, достаточном для активации *OxyR*-регулона [4]. Расхождение результатов может быть связано как с ограничением времени наблюдения в цитируемой работе до двух часов, так и с различием условий культивирования, в том числе более высокими интенсивностью аэрации и скоростью гибели клеток по сравнению с этими показателями в наших экспериментах.

Вовлеченность эндогенных АФК в бактерицидное действие антибиотиков можно оценить с помощью антиоксидантов. Предполагается, что, если продукция АФК вносит вклад в гибель клеток под действием антибиотиков, антиоксидант, нейтрализуя АФК, будет способствовать повышению жизнеспособности бактерий. В данной работе в качестве антиоксиданта использована тиомочевина, основой антиоксидантного действия которой является способность нейтрализовать пероксид водорода [19]. Также показано, что тиомочевина может снижать продукцию гидроксильного радикала *in vitro* и *in vivo* [3, 20], что может быть связано с ее способностью взаимодействовать с  $H_2O_2$ , который является субстратом в реакции Фентона, продуцирующей гидроксильные радикалы. Кроме того, продемонстрирована способность тиомочевины нейтрализовать супероксидные анионы [21].

В отличие от подходов, использованных в ранее опубликованных работах, наши эксперименты по изучению влияния тиомочевины на восприимчивость *E. coli* к антибиотикам проводились в условиях микроаэрации, близких

к условиям естественных мест обитания данных бактерий, где они подвергаются воздействию антибиотиков. Защитный эффект тиомочевины наблюдался только на клетках, подвергнутых действию фторхинолонового антибиотика (таблица). Ранее было показано, что в условиях интенсивной аэрации добавка тиомочевины защищает бактериальные клетки от воздействия летальных доз как фторхинолонов, так и  $\beta$ -лактамов и аминогликозидов [3]. Это можно расценивать как подтверждение того, что вклад вторичного окислительного стресса в антибактериальное действие пропорционален доступности кислорода (интенсивности аэрации среды). Последнее справедливо как для антибактериальных препаратов, так и других стрессорных воздействий [22]. Кроме того, можно предположить, что из трех исследованных групп антибиотиков наибольший вклад продукция АФК вносит в антибактериальное действие фторхинолонов.

Следует отметить, что эффект тиомочевины зависел от концентрации (силы антибактериального воздействия) антибиотика. Антиоксидант не оказывал влияния на ингибиторное действие антибиотика, усиливал сублетальное и снижал его летальное воздействие. Измерение уровня генной экспрессии в этих условиях показало, что внесение тиомочевины снижает отклик системы антиоксидантной защиты (*OxyR*-регулон), активированной в ответ на добавку антибиотика (таблица). Если в случае сублетального воздействия средней силы экспрессия *oxyR* при добавке тиомочевины снижалась почти до контрольного уровня, то в клетках, подвергнутых действию антибиотика в более высоких дозах, экспрессия антиоксидантного регулона оставалась на сравнительно высоком уровне. Это свидетельствует о важной роли активации *OxyR*-регулона в защите бактериальных клеток от вторичного окислительного стресса, вызванного воздействием антибиотика. Кроме того, полученные результаты могут быть интерпретированы как свидетельство не только повреждающей активности, но и сигнальной роли АФК в стрессовых условиях. При этом такая роль не ограничивается активацией систем защиты от окислительного стресса, но также может распространяться на регулятор общего стрессового ответа *rpoS*, помпы множественного лекарственного выброса, регуляцию проницаемости клеточной стенки и др. [23–25].

Таким образом, АФК, накопление которых сопровождается воздействием  $\beta$ -лактамов, аминогликозидных и фторхинолоновых антибиотиков, в условиях микроаэрации оказывают влияние на антибактериальный эффект только фторхинолонов. Снижение интенсивности вторичного окислительного стресса и, соответственно, отклика систем антиоксидантной защиты за счет добавки антиоксиданта тиомочевины усиливает сублеталь-

ное воздействие антибиотика и снижает эффективность его летальных доз.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Брюсу Демплу (Stony Brook University Medical School, Stony Brook, N.Y.) за предоставленные штаммы *E. coli*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Albesa I., Becerra M., Battán P., Páez P.* Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 317. N 2. P. 605–609.
2. *Becerra M., Paez P., Larovere L., Albesa I.* Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin // *Mol. Cell. Biochem.* 2006. Vol. 285. N 1–2. P. 29–34.
3. *Kohanski M., Dwyer D., Hayete B., Lawrence C., Collins J.* A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // *Cell.* 2007. Vol. 130. N 5. P. 797–810.
4. *Liu Y., Imlay J.* Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species // *Science.* 2013. Vol. 339. N 6124. P. 1210–1213.
5. *Van Acker H., Coenye T.* The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria // *Trends Microbiol.* 2017. Vol. 25. N 6. P. 456–466.
6. *Hong Y., Zeng J., Wang X., Drlica K., Zhao X.* Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019. Vol. 116. N 20. P. 10064–10071.
7. *Goswami M., Mangoli S., Jawali N.* Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol. 50. N 3. P. 949–954.
8. *Wang X., Zhao X.* Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. Vol. 53. N 4. P. 1395–1402.
9. *Dwyer D., Belenky P., Yang J., et al.* Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Vol. 111. N 20. P. 2100–2109.
10. *Akhova A., Tkachenko A.* ATP/ADP alteration as a sign of the oxidative stress development in *Escherichia coli* cells under antibiotic treatment // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. Vol. 353. N 1. P. 69–76.
11. *Battan P., Barnes A., Albesa I.* Resistance to oxidative stress caused by ceftazidime and piperacillin in a biofilm of *Pseudomonas* // *Luminescence.* 2004. Vol. 19. N 5. P. 265–70.
12. *Boles B., Singh P.* Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105. N 34. P. 12503–12508.
13. *Kohanski M., DePristo M., Collins J.* Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis // *Mol. Cell.* 2010. Vol. 37. N. 3. P. 311–320.
14. *Imlay J.* Pathways of oxidative damage // *Annu. Rev. Microbiol.* 2003. Vol. 57. P. 395–418.
15. *Koutsolioutsou A., Peña-Llopis S., Demple B.* Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49. N. 7. P. 2746–2752.
16. *Sato Y., Unno Y., Miyazaki C., Ubagai T., Ono Y.* Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* resists reactive oxygen species and survives in macrophages // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. N 1: 17462.
17. *Ding H., Demple B.* In vivo kinetics of a redox-regulated transcriptional switch // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. Vol. 94. N 16. P. 8445–8449.
18. *Miller J.H.* Experiments in molecular genetics. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 466 pp.
19. *Randall L.* Reaction of thiol compounds with peroxidase and hydrogen peroxide // *J. Biol. Chem.* 1946. Vol. 164. N 2. P. 521–527.
20. *Anbar M., Neta P.* A compilation of specific bimolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution // *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 1967. Vol. 18. N 7. P. 493–523.
21. *Kelner M., Bagnell R., Welch K.* Thioureas react with superoxide radicals to yield a sulfhydryl compound. Explanation for protective effect against paraquat // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. N 3. P. 1306–1311.
22. *Mols M., Pier I., Zwietering M., Abee T.* The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus* // *Int. J. Food Microbiol.* 2009. Vol. 135. N 3. P. 303–311.
23. *Fraud S., Poole K.* Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. Vol. 55. N 3. P. 1068–1074.
24. *Wang X., Kim Y., Hong S., Ma Q., Brown B., Pu M., Tarone A., Benedik M., Peti W., Page R., Wood T.* Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response // *Nat. Chem. Biol.* 2011. Vol. 7. N 6. P. 359–366.
25. *Tkachenko A.* Stress responses of bacterial cells as mechanism of development of antibiotic tolerance // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. Vol. 54. N 2. P. 108–127.

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.

После доработки 28.08.2020 г.

Принята в печать 29.09.2020 г.

## RESEARCH ARTICLE

## Role of secondary oxidative stress in the bactericidal action of antibiotics

A.V. Akhova\* , A.G. Tkachenko 

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center,  
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Golev st. 13, Perm, 614081, Russia*  
\*e-mail: akhovan@mail.ru

Exposure to  $\beta$ -lactam, fluoroquinolone and aminoglycoside antibiotics caused an increase in the production of hydrogen peroxide and the expression of OxyR-regulon of the oxidative stress response in *Escherichia coli* cells. Under the conditions of microaeration, the attenuation of secondary oxidative stress due to the addition of an antioxidant thiourea affected the antibacterial effect of fluoroquinolones. Thiourea potentiated the effect of sub-lethal (which did not reduce the number of colony-forming units below  $10^3$ /mL) doses of the antibiotic and increased the viability of cells exposed to lethal doses. The addition of thiourea reduced the expression of OxyR-regulon, increased by the sub-lethal antibiotic action, to an antibiotic-free culture level. When exposed to lethal doses, a decrease in the antibiotic-mediated expression of oxidative stress response genes in the presence of thiourea was also observed, however, the expression level remained higher as compared to an antibiotic-free culture. This may indicate the dual role of ROS under antibiotic treatment as the damaging agents contributing to killing and the signal molecules activating stress responses.

**Keywords:** reactive oxygen species, antibiotic, fluoroquinolones, hydrogen peroxide, OxyR-regulon, catalase

### Сведения об авторах

Ахова Анна Викторовна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН. Тел.: 8-342-212-2159; e-mail: akhovan@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3477-750X>

Ткаченко Александр Георгиевич – докт. мед. наук, зав. лабораторией адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН. Тел.: 8-342-212-2159; e-mail: agtkachenko@iegm.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8631-8583>