

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ФЛАВОНОИДОВ ГРЕЧИХИ ПОСЕВНОЙ

И.А. Гнеушева

к.т.н., доцент кафедры биотехнологии,
Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина (г. Орёл, Россия)
E-mail: obc1-2010@mail.ru

И.Ю. Солохина

к.б.н., доцент кафедры биотехнологии,
Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина (г. Орёл, Россия)
E-mail: solohinairina@yandex.ru

А.В. Лушников

гл. специалист, ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии»,
Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина (г. Орёл, Россия)
E-mail: alex_de-vil@mail.ru

Флавоноиды гречихи представлены широким спектром биологически активных веществ полифенольной природы. Наибольшей биологической активностью обладают рутин и антоцианы гречихи.

Цель исследования – оценка биологических эффектов полифенольного комплекса гречихи посевной.

Материал и методы. В качестве объектов исследования использовали рутин, антоцианы, препарат полифенольной природы, выделенные из цветков и вегетативной массы гречихи. Чувствительность к антибиотическим препаратам и минимальную ингибирующую концентрацию определяли диско-диффузионным методом и методом серийных разведений. Осмотическую резистентность *E. coli* оценивали денситометрически с варьированием концентрации NaCl. Адгезивную активность определяли по количеству бактериальных клеток, прикрепившихся к эритроцитам. Активность β-галактозидазы устанавливали по изменению оптической плотности при длине волны 405 нм. Протеазную активность анализировали, инкубируя биоматериал с трихлоруксусной кислотой с последующим расчетом активности по калибровочной кривой с тирозином. Активность фермента супероксиддисмутазы определяли методом спектрофотометрии при длине волны 550 нм, а активность каталазы – при длине волны 240 нм. Содержание углеводов выявляли по реакции с фенолом в присутствии серной кислоты при длине волны 440 нм. Количественное содержание редуцирующих веществ определяли по Вешнякову, общее содержание белка в биомассе – по Бредфорду. Содержание пептона количественно устанавливали по реакции с биуретовым реактивом. Анализ белков выполняли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

Результаты. Проведено исследование антибиотической активности флавоноидов гречихи и препаратов на их основе, установлены минимальные концентрации рутина и антоцианов из цветков гречихи – 6,13 и 2,62 мкг/мл соответственно, которые подавляют рост бактерий *E. coli* ATCC 25922. При совместном инкубировании β-лактамных антибиотиков с флавоноидами гречихи посевной выявлено, что активные компоненты, рутин из цветков и антоцианы из вегетативной массы гречихи, снижают минимальную ингибирующую концентрацию амоксициллина в среднем на 34–36%, меропенема – на 20–22%, цефазолина – на 16–18%. По результатам исследования влияния флавоноидов гречихи на осмотическую резистентность и адгезивность *E. coli* показано, что рутин из цветков гречихи вызвал эффективное снижение данных показателей. Показатели активности утилизации *E. coli* пептона, а также удельная активность протеаз снижались под действием рутина и антоцианов. Фенольные соединения, рутин и антоцианы, способствуют снижению показателей утилизации углеводных компонентов и удельной активности β-галактозидазы при совместном инкубировании с изолятом *E. coli*. Антоцианы из вегетативной массы гречихи обладают антиоксидантной активностью, вызывая значительное повышение показателей активности супероксиддисмутазы и каталазы.

Выводы. При исследовании биологических свойств флавоноидов гречихи установлена специфичность действия их компонентного состава. Выявлены наиболее активные соединения полифенольного комплекса гречихи посевной – рутин из цветков и антоцианы из вегетативной массы, обладающие бактериостатической активностью в отношении *E. coli* вследствие прооксидантного действия и нарушения целостности клеточной стенки бактерии. Кроме того, рутин и антоцианы проявляют слабый бактериостатический эффект в отношении фитопатогенных возбудителей. Антоцианы гречихи, индуцируя окислительный стресс, вызывают впоследствии нарушение целостности ДНК *E. coli*. Соединения фенольного комплекса гречихи посевной, обладающие выраженной биологической активностью, могут быть рекомендованы в качестве компонентов для создания антисептических растворов наружного применения.

Ключевые слова: гречиха посевная, флавоноиды, рутин, антоцианы, *E. coli*, адгезивность, электрофорез, β-галактозидаза, протеазная активность, супероксиддисмутаза, каталаза.

Для цитирования: Гнеушева И.А., Солохина И.Ю., Лушников А.В. Биологические эффекты флавоноидов гречихи посевной. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(6):28–39. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-06-04>

Современная наука продолжает активно продвигаться навстречу «зеленым» биотехнологиям, которые обеспечивают экологичность производства биопродукции (красителей, пищевых добавок, лекарственных средств растительного происхождения и др.). В настоящее время пристальное внимание исследователей в мире привлекают продукты вторичного метаболизма растений – флавоноиды.

Флавоноиды – это растительные фенольные соединения, структурную основу которых составляют два бензильных кольца (А и В), соединенных друг с другом гетероциклическим пираном или пиронином (кольцо С) [1].

Разнообразие природных флавоноидов достигается вследствие того, что они содержат в своей структуре гидроксильные и метоксильные группы в различных положениях. Эти соединения придают окраску растительным тканям (антоцианы – красную; ауроны, халконы – желтую и оранжевую) и обладают широким спектром биологического действия, выполняя в растениях разные функции (участвуют в процессах репродукции, развития и функционирования пыльцы, накопления нектара, созревания плодов и семян, отвечают за пигментацию, участвуют в защите растений от различных неблагоприятных факторов окружающей среды и др.) [2, 3].

Экспериментальные и клинические исследования выявили антиоксидантные, антиаллергические, цитопротекторные, гепатозащитные, антигипоксические и многие другие эффекты флавоноидов [4]. Данные природные вещества и их аналоги являются эссенциальными для организма, то есть требующими постоянного поступления с продуктами растительного происхождения [5].

Наибольшее внимание относительно действия флавоноидов на организм следует уделить их антиоксидантной активности (АОА). Флавоноиды могут быть отнесены к неферментным антиоксидантам, способным прямо или косвенно ослаблять, или предупреждать клеточные повреждения, вызываемые свободными радикалами [6].

Например, флавоноиды расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) проявляют в 10 раз более высокий антиоксидантный потенциал, чем фенольные антиоксиданты (токоферолы) [7].

Интересно, что одни и те же флавоноиды могут проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства, что, по-видимому, определяется используемой концентрацией и различными условиями окружающей среды.

Наряду с антиоксидантными свойствами противовоспалительная активность многих флавоноидов известна на протяжении многих лет. Противовоспалительное действие обусловлено активацией системы Keap/Nrf2/ARE, определяющей уровень экспрессии противовоспалительных генов, обеспечивающих формирование воспалительной реакции.

Противовоспалительная активность флавоноидов, связанная с воздействием на различные звенья цепи воспалительной реакции, реализуется за счет ингибирования индукции тканевых медиаторов воспаления – цитокинов и метаболитов арахидоновой кислоты [8].

Полифенольный комплекс пятилистника кустарникового (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz) проявляет интерферогенное и иммуностимулирующее действие, повышая антителообразующую активность клеток селезенки экспериментальных животных (белых мышей), иммунизированных эритроцитами барана [9].

Молекулярные механизмы про- и антиапоптотического действия флавоноидов изучены недостаточно. Но обнаружено, что кверцетин и винные полифенолы предупреждают гибель эндотелиальных клеток, нивелируя их дисфункцию, что показано в исследованиях *in vivo* снижением кровяного давления у экспериментальных животных с моделью артериальной гипертензии [10].

В ряде работ описана антимикробная активность различных флавоноидов в отношении метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*. Флавоноиды ингибировали рост микроорганизма за счет нарушения стабильности бактериальной мембраны и подавления активности β-лактамазы [11].

Потенциальными колорантами для пищевой и медицинской промышленности являются антоцианы [12, 13]. Для антоцианов в настоящее время доказаны следующие виды фармакологической активности: вазопротекторная, антиоксидантная, противовоспалительная, противоопухолевая, защита зрительного аппарата, фунгицидная и антимикробная [14].

Поиск новых возможностей расширить круг доступных биоактивных соединений, способных защитить организм человека и животного от различных абиотических и биотических факторов, в настоящее время является приоритетной задачей прикладных медицинских и биологических исследований.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – оценка некоторых биологических эффектов флавоноидов гречи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench.).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в условиях ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» ФГБОУ ВО «Орловский ГАУ». В качестве объектов исследования в работе использовали рутин (Рц), антоцианы (Ац), выделенные из цветков гречихи, и препарат полифенольной природы (ППц) также из цветков гречихи; рутин (Рвм), антоцианы (Авм), выделенные из вегетативной массы гречихи, и препарат полифенольной природы (ППвм), также из вегетативной массы гречихи.

Для извлечения группы флавоноидов из растительного сырья использовали экстрагенты с различной полярностью с последующим разделением фракций хроматографическим методом (по авторской методике И.А. Гнеушевой, И.Ю. Солохиной) [15]. В качестве препарата сравнения использовали «Флавитал» (Ханкинтатукку Оу, Финляндия), поскольку он является источником флавоноидов с различной химической структурой и биологической активностью.

Определение чувствительности к антибиотическим препаратам и минимальной ингибирующей концентрации проводили по МУК 4.2.1890-04 [16]. Для определения чувствительности микроорганизмов к опытным препаратам и их МИК (минимальная ингибирующая концентрация) применяли диско-диффузионный метод и метод серийных разведений. Диски нагружали препаратами и высушивали до полного удаления растворителей при температуре +6 °С. Среду инокулировали 1 мл взвесью суточной тест-культуры, с мутностью, соответствующей 0,5 McF. Инкубировали 24 ч при 35 °С, результат оценивали визуально. На основе бульонной среды готовили серийные разведения препаратов, инокулировали бактериальной взвесью, получив конечную концентрацию $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, инкубировали 24 ч при 35 °С с орбитальным перемешиванием 600 мин^{-1} , результат оценивали денситометрически в двухволновом режиме 450/680 нм (+6 °С – контроль).

Биоавтография. На пластину Sorbifil ($L = 50 \text{ мм}$) наносили исследуемый препарат и помещали в камеру с системой элюентов хлороформ:метанол (3:1). Хроматографию останавливали при заполнении элюентом всего сорбента, пластины извлекали и высушивали до полного удаления растворителей. Готовую пластину делили на полоски с заданными размерами и апплицировали каждую на газонную культуру тестируемо-

го микроорганизма. Инкубировали 24 ч при 35 °С, результат учитывали визуально, определяли R_f активной фракции.

Определение осмотической резистентности. Ставили ряд опытов с варьированием концентрации NaCl от 1 до 13% с шагом 1%. В качестве питательной основы использовали стандартную рецептуру среды ГФМ-бульон. Инкубировали 24 ч при 35 °С с орбитальным перемешиванием 600 мин^{-1} , контрольный образец помещали в холодильник. Результат оценивали денситометрически в двухволновом режиме 450/680 нм с бланком по контрольному образцу. По изменению оптической плотности рассчитывали процент плазмолиза:

$$\% = D_x / D_k \times 100.$$

Определение адгезивных свойств по Брилис (1986) [17]. Каплю взвеси эритроцитов I (Rh^+) и бактерий в физиологическом растворе 0,5 и 4 McF, соответственно, наносили на стекло, смешивали, инкубировали 30 мин при температуре 37 °С. Готовили мазки, с комбинированной окраской по Граму и Романовскому–Гимзе. Адгезивную активность определяли количеством бактериальных клеток, прикрепившихся к 5 эритроцитам в пяти полях зрения:

СПА (средний показатель адгезии)

КУЭ (коэффициент участия эритроцитов)

ИАМ (индекс адгезивности микроорганизма):

$$\text{ИАМ} = \frac{\text{СПА}}{\text{КУЭ}} \times 100.$$

Бактерия считается: неадгезивной – $\text{ИАМ} \leq 1,75$; низкоадгезивной – $\text{ИАМ} \leq 1,76-2,5$; среднеадгезивной – $\text{ИАМ} \leq 2,51-4,0$; высокоадгезивной – $\text{ИАМ} > 4,0$.

Определение активности β-галактозидазы проводили по Craven (1965) [18]. Реакционную смесь, содержащую 0,05М о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида и 0,1М фосфата калия, соединяли с исследуемым материалом в соотношении 1:100 и инкубировали 1 мин при комнатной температуре. Активность β-галактозидазы определяли по изменению оптической плотности при длине волны 405 нм в течение 60 с, $\epsilon_{405} \text{ о-НФГ} = 3500 \text{ л} \times \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

Определение протеазной активности проводили по Anson (1938) [19]. Равные объемы биоматериала совместно инкубировали 15 мин при температуре +25 °С, добавляли четыре объема 3М раствора трихлоруксусной кислоты, встряхивали и центрифугировали 5 мин с ускорением 10000 g. Для расчета активности использовали калибровочную кривую по тирозину.

Определение активности супероксиддисмутазы по McCord & Fridovich (1969) [20]. За единицу активности супероксиддисмутазы принимали количество фермента, необходимое для ингибирования реакции восстановления цитохрома С на 50%. Реакционная смесь содержала 50 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,8; 0,1 мМ ЭДТА; 50 мкМ ксантина натриевой соли; 1,7 мЕ ксантиноксидазу; 10 мкМ цитохром С. Соотношение «образец:рабочий реактив» = 1:30. Пробы инкубировали 30 мин, при температуре +25±0,5 °С, оптическую плотность измеряли при λ 550 нм, l = 1 см.

Определение активности каталазы по Beers&Sizer (1952) [21]. Реакционная смесь содержала 13 мМ Н₂О₂ в 0,5 М Трис/НСl-буфере, рН 8,0. Измеряли спектрофотометрически при +25 °С, при λ=240 нм, l=1 см, ε₂₄₀=39,4 М⁻¹·см⁻¹. За единицу активности каталазы принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль Н₂О₂ в мин⁻¹.

Количественное определение общего содержания углеводов по Dubois et al. (1956) [22]. Общее содержание углеводов устанавливали по реакции с фенолом в присутствии серной кислоты. Реакционная смесь содержала 1 часть биоматериала, 1 часть 5%-ного раствора фенола и 5 частей концентрированной серной кислоты. Пробы перемешивали, инкубировали 15 мин при температуре +10 °С. Измеряли оптическую плотность при 488 нм против контрольного образца. Концентрацию в пробах определяли по стандартной калибровочной кривой.

Количественное определение сахарозы. В мерной колбе соединяли 10 частей образца и 1 часть

НСl_{конц.} (ρ_{20°С} = 1,188) инкубировали 8 мин при температуре 68–70 °С, с перемешиванием, охлаждали до 20 °С. Реакционную смесь нейтрализовали 20%-ным раствором NaOH, контролируя процесс по индикаторной бумаге, довели водой до метки. В полученном растворе определяли содержание редуцирующих веществ по Вешнякову [23]. Концентрацию сахарозы рассчитывали по формуле

$$C_{сах} = (C_{и} - C_0) \times 0,95,$$

где C_и – концентрация РВ после инверсии; C₀ – концентрация РВ до инверсии; 0,95 – коэффициент пересчета инвертата в сахарозу.

Количественное определение общего содержания белка в биомассе по Bradford (1976) [24]. К пробам, разведенным в 100 раз, добавляли реактив Бредфорда в соотношении 1:50, инкубировали при комнатной температуре до появления окраски. Оптическую плотность измеряли в кювете с длиной оптического пути 1 см, при λ = 595нм. Концентрацию в пробах рассчитывали по стандартной калибровочной кривой.

Количественное определение содержания пептона в питательной среде по МУК 4.2.2316-08 [25]. К 5 частям испытуемого раствора добавляли 1 часть биуретового реактива. Одновременно готовили контрольную пробу и проводили определение, как описано при построении калибровочной кривой. Концентрацию пептона в испытуемом растворе в процентах вычисляли по калибровочной кривой и выполняли перерасчет с учетом разведения.

Амплификаты разделяли электрофорезом в 2%-ном геле агарозы на 50×ТАЕ-буфере, окрашивали 1%-ным бромистым этидием. Результат регистрировали на трансиллюминаторе (Биоком) (табл. 1).

Таблица 1. Программа для амплификации тест-систем

А			Б		
t, °С	Время, с	Число циклов	t, °С	Время, с	Число циклов
93	Пауза	–	94	Пауза	–
93	30	35	94	90	
59	30		94	10	40
72	30		64	10	
10	Хранение	–	72	40	–
–	–	–	72	120	
–	–	–	10	Хранение	

Примечание: А – «Резистентность к цефалоспорином – 1»; Б – «Резистентность к карбапенемам– 1, 2» и «Резистентность к пенициллинам».

Электрофорез белков в редуцирующих условиях по Laemmli (1970) [26]. Электрофорез проводили по методу с некоторыми изменениями на геле размером 7×8×0,1 см. Разделяющий гель (T=12%; C=5%) содержал: 0,375 М Трис-HCl pH 8,7; 10% SDS; 8 мкл ТЕМЕД; 80 мкл 10%-ного раствора персульфата аммония. Электродный буфер содержал: 0,025 М Трис; 0,192 М глицина; 0,1% SDS – pH 8,3. Буфер для разведения образцов содержал: 3 мл 1 М Трис-HCl, pH 6,8; 1 г SDS; 2,5 мл 2-меркаптоэтанола; 3 мл глицерина; 0,05 г БФС. Образец смешивали в соотношении 3:1 с БРО, кипятили 5 мин на водяной бане, охлаждали до комнатной температуры. Экспонировали при температуре +10°C, V = 180 В на гель до выхода фронта красителя из геля. Гель фиксировали,

окрашивали раствором Кумасси G-250, 10 мин при 65–80 °С. Фоновую окраску отмывали кипячением в 5%-ной уксусной кислоте 15 мин.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ MS Excel 2010. Все опыты выполняли в пятикратной повторности. Результаты исследований представлены в виде средних арифметических значений с доверительным интервалом при уровне вероятности $p = 0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследования определяли антибиотическую активность флавоноидов гречихи и препаратов на их основе в комбинациях (табл. 2) в отношении тест-объектов, условно-патогенных и фитопатогенных микроорганизмов.

Таблица 2. Зоны подавления роста тест-культур флавоноидами гречихи и препаратами на их основе

Препарат	Тест-культура								K _A
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>P. syringae</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>A. cucumris</i>	<i>P. destructiva</i>	
	Ø зоны подавления роста X _{cp} ±σ, мм								
Контроль (амфотерицин В)	6,0	6,0	6,0	22,8±0,7	6,0	6,0	23,6±0,5	22,4±0,8	12,35
Контроль (ципрофлоксацин)	22,3±0,1	21,8±0,6	22,7±0,8	6,0	23,5±0,7	23,1±0,4	6,0	6,0	16,43
Контроль (хлоргексидин)	18,2±0,3	19,5±0,5	18,4±0,3	16,6±0,7	19,3±0,4	20,4±0,9	16,7±0,1	17,5±0,2	18,33
Рц	11,8±0,1	10,7±0,2	10,4±0,1	12,3±0,6	13,2±0,05	12,7±0,1	15,8±0,09	16,4±0,7	12,91
Ац	10,5±0,1	9,9±0,04	7,1±0,4	6,2±0,5	9,7±0,1	10,1±0,04	6,4±0,4	6,7±0,2	8,80
ППц	9,1±0,06	6,9±0,8	6,5±0,9	6,0	7,9±0,2	8,1±0,7	6,0	6,0	7,06
Рвм	9,2±0,02	8,8±0,6	8,3±0,1	7,1±0,2	10,3±0,02	12,5±0,6	9,8±0,1	8,4±0,9	9,30
Авм	8,7±0,08	7,4±0,04	7,1±0,08	6,0	6,7±0,08	7,4±0,04	6,0	6,0	6,66
ППвм	8,2±0,1	6,8±0,06	7,5±0,3	6,0	7,2±0,1	6,8±0,06	6,0	6,0	6,69

Примечание: чувствительность: ≤ 6 – отсутствует; 6,1–12,0 – слабая; 12,1–18,0 – средняя; 18,1≤ – высокая; (x±I₉₅, n=5)

Таблица 3. Минимальные концентрации флавоноидов гречихи и препаратов на их основе, подавляющие рост бактерий *E. coli* ATCC 25922 (x±I₉₅, n=5)

Препарат	X _{cp} ±σ, мкг/мл
Рц	6,13±0,5
Ац	2,62±0,2
ППц	9,61±0,7
Рвм	15,04±1,3
Авм	46,1±3,6
ППвм	12,9±0,3

В табл. 2 показано, что представленные препараты флавоноидов гречихи, особенно рутин и антоцианы из цветков гречихи, дают заметно лучшие результаты в экспериментах с условно-патогенными бактериями. Для исследуемых препаратов на этапе диско-диффузионного скрининга методом серийных разведений определены минимальные концентрации, подавляющие рост бактерий *E. coli* ATCC 25922 (табл. 3).

Препараты флавоноидов – рутин и антоцианы из цветков гречихи, при минимальных концентрациях 6,13 и 2,62 мкг/мл соответственно подавляют рост бактерий *E. coli* ATCC 25922. В дальнейшей работе были использованы субингибирующие

концентрации данных препаратов, рассчитанные как $S_{убик} = M_{ИК} - 0,25 M_{ИК}$.

По итогам скрининга микроорганизмов из коллекции кафедры биотехнологии Орловского ГАУ для исследования влияния флавоноидов гречихи на МИК β -лактамных антибиотиков, подобран клинический изолят *E. coli*, показавший наибольшую чувствительность к представленной группе препаратов, проверенный на отсутствие генов резистентности VIM, CTX-M, TEM и генетических маркеров EAEC. В качестве β -лактамных антибиотиков использовали пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, которые дольше всех применяются в клинической практике, в связи с этим проблема резистентности к ним наиболее серьезна.

Для выявления толерантности бактерий, в нашем случае *E. coli*, к определенному антибиотику использовали показатель минимальной ингибирующей концентрации (МИК). МИК – это наимень-

шая концентрация антибиотиков, которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост бактерий.

Результаты МИК β -лактамных антибиотиков представлены на рис. 1.

В результате эксперимента установлено, что при совместной инкубации с флавоноидами гречихи и препаратами на их основе наблюдается ощутимое повышение эффективности β -лактамных антибиотиков (кроме ципрофлоксацина) за счет увеличения чувствительности тест-культуры к соответствующему веществу. По данным диаграммы очевидно, что флавоноиды гречихи – рутин из цветков гречихи и антоцианы из вегетативной массы гречихи способны снижать МИК амоксициллина в среднем на 34–36%, меропенема на 20–22%, цефазолина на 16–18%. При использовании данных препаратов совместно с ципрофлоксацином в проведенном исследовании снижения МИК антибиотика не было выявлено.

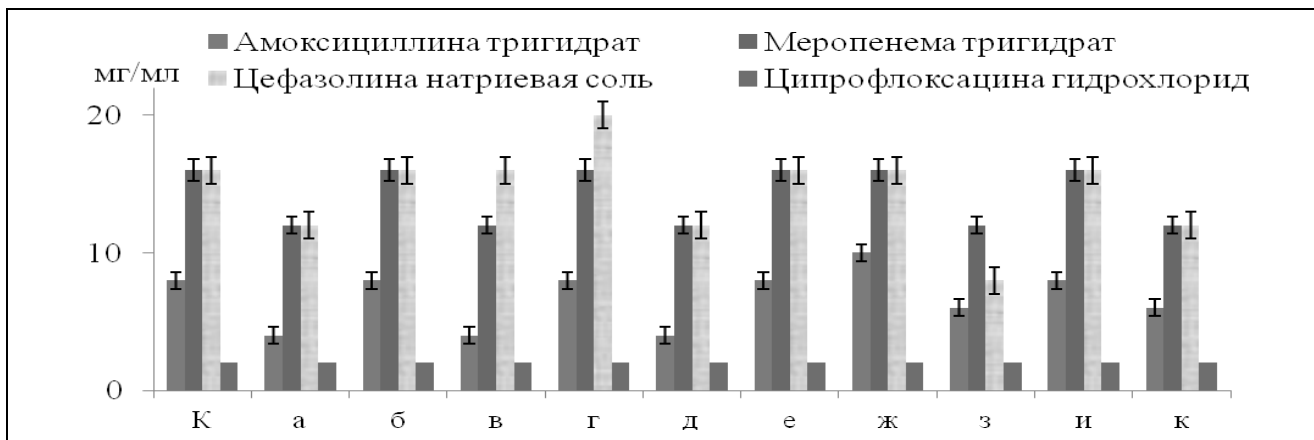


Рис. 1. Результаты МИК β -лактамных антибиотиков при совместном инкубировании антибиотиков с флавоноидами гречихи и препаратами на их основе: К – контроль (без флавоноидов), а – с Рц, б – с Ац, в – с ППц, г – с Рвм, д – с Авм, е – с ППвм, ж – с Рц+Рвм, з – с Ац+Авм, и – с ППц+ППвм, к – контроль (флавитал) ($\chi \pm I_{95}$, $n=5$)

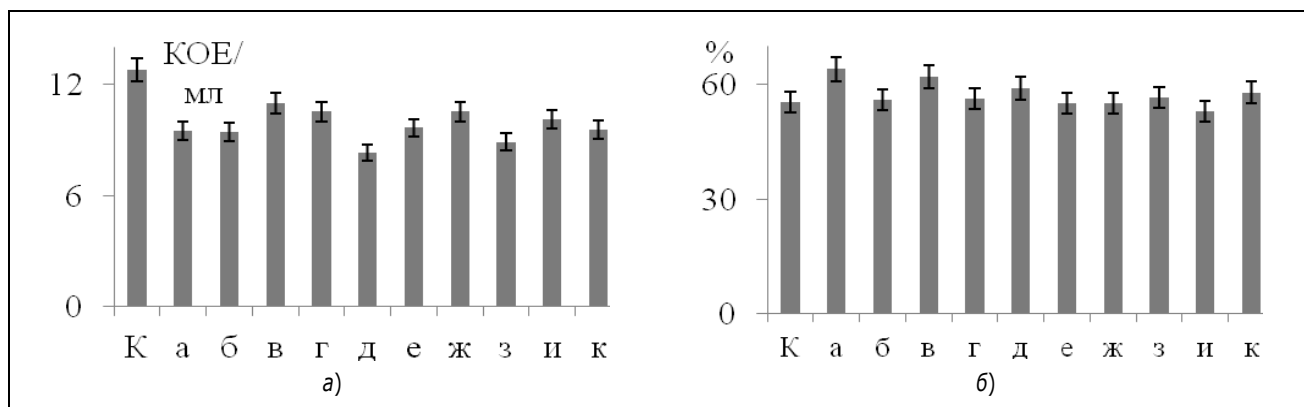


Рис. 2. Прирост биомассы (а) и показатель плазмолиза (б) *E. coli* при совместном инкубировании с препаратами: К – контроль, а – Рц, б – Ац, в – ППц, г – Рвм, д – Авм, е – ППвм, ж – Рц+Рвм, з – Ац+Авм, и – ППц+ППвм, к – контроль (флавитал) ($\chi \pm I_{95}$, $n=5$)

Изучая термолабильность клинического изолята *E. coli* в процессе культивирования при варьировании температуры инкубации ранее нами было показано, что наблюдается уменьшение прироста биомассы бактерии в среднем более чем на 20% [27]. Подобный эффект возникал в экспериментах с флавоноидами, показавший как умеренный, так и низкий бактериостатический эффект в стандартных условиях. В эксперименте с образцами антоцианов из цветков и вегетативной массы гречихи отмечен наименьший прирост бактериальной биомассы примерно на 33–35% ниже, чем в контрольной культуре (рис. 2,а).

При испытании осмотической резистентности *E. coli* рутин, полифенольный препарат из цветков гречихи и антоцианы из вегетативной массы гречихи, препарат сравнения «Флавитал» усиливают

угнетение роста микроорганизма уже при 2% соли. Наибольший эффект наблюдается в эксперименте с рутином из цветков гречихи (рис. 2,б).

В среднем данный образец увеличивает плазмолиз на 31,12% ($p < 0,05$). Действительно, модификация клеточной стенки, вызванная влиянием факторов внешней среды, неизбежно приводит к изменению ее функционального статуса. Сдвиг внутриклеточного осмотического давления является признаком физиологической несостоятельности клеточной стенки, что сопровождается угнетением роста культуры.

На эритроцитах группы I (Rh⁺) тест-культура, клинический изолят *E. coli* показал высокую адгезивность: индекс адгезивности микроорганизма 5,35 при среднем показателе адгезивности 4,08 и коэффициенте участия эритроцитов 76,28% (рис. 3).

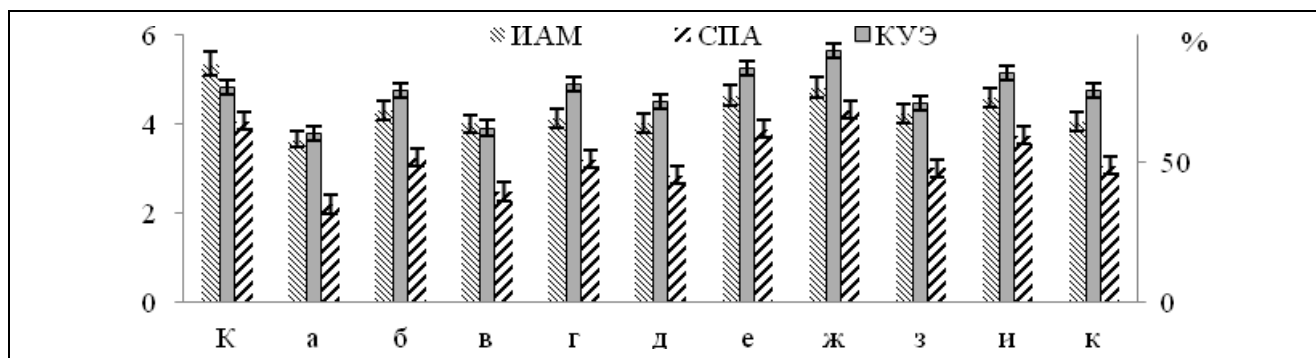


Рис. 3. Адгезивность *E. coli*; К – контроль, а – Рц, б – Ац, в – РПц, г – Рвм, д – Авм, е – ППвм, ж – Рц+Рвм, з – Ац+Авм, и – РПц+ППвм, к – контроль (флавитал) ($\bar{x} \pm I_{95}$, $n=5$)

В сравнении с контролем все препараты дают снижение адгезивности клеток *E. coli* в среднем более 24% до показателей ИАМ 3,45–4,78% при СПА 2,60–3,36% и КУЭ 68,72–86,96%. Наиболее выраженное уменьшение адгезивности вызвал рутин из цветков гречихи: снижение ИАМ – на 35,5%, СПА – на 36,3%, КУЭ – на 9,91% ($p < 0,05$). Очевидно, опытные препараты уменьшают способность кишечных палочек к адгезии на мембраны клеток. Можно предположить, что данное явление вызвано образованием комплексов препарата с фимбриальными структурами – адгезинами, и/или их деструктивным действием.

Основным источником азота является пептон, который представляет собой продукт неполного ферментативного гидролиза белков, состоящий из отдельных аминокислот, ди-, три- и полипептидов. Пептон расщепляется комплексом экзоферментов до аминокислот, которые простой диффузией про-

никают в клетку.

При совместном инкубировании с рутином из цветков гречихи и антоцианами из вегетативной массы гречихи наблюдалось резкое сокращение потребления пептона среды на 32,4 и 24,2% ($p < 0,05$) соответственно (рис. 4). Почти такой же эффект наблюдается и у препарата сравнения «Флавитал».

Количество белка в экстракте биомассы уменьшилось на 49,4 и 58,1% ($p < 0,05$) и коррелирует со снижением утилизации пептона ($r = 0,847$, $p = 0,001$). Данная зависимость подтверждается изменением удельной активности протеаз, коррелирующим с показателями концентрации белкового компонента клетки и среды: $r = 0,911$ и $r = 0,909$ соответственно ($p < 0,05$).

Стоит отметить, что изменение количества белка в биомассе не отражается на его качественном составе (рис. 5).

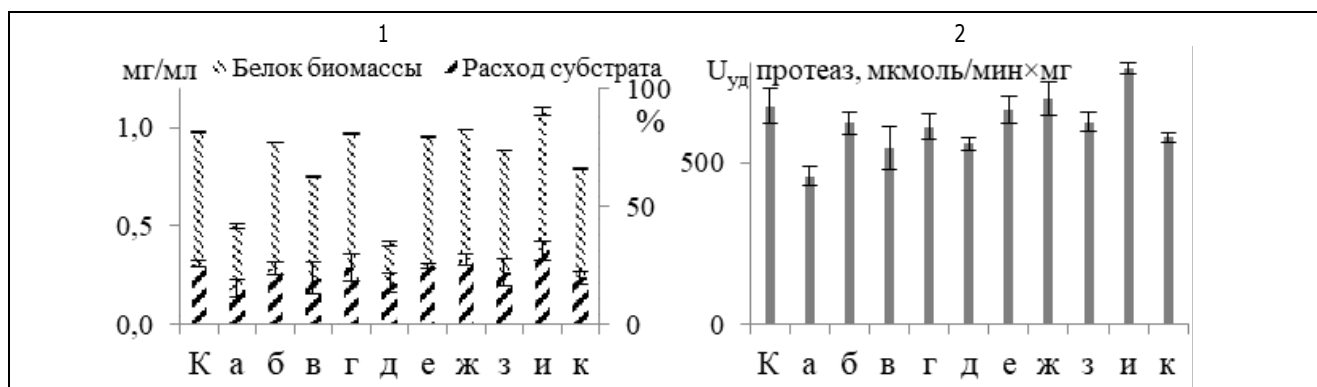


Рис. 4. Показатели активности утилизации *E. coli* пептона: 1 – баланс белка биомасса/среда; 2 – удельная активность протеаз; К – контроль, а – Рц, б – Ац, в – ППц, г – Рвм, д – Авм, е – ППвм, ж – Рц-Рвм, з – Ац+Авм, и – ППц+ППвм, к – контроль (флавитал) ($\bar{x} \pm I_{95}$, $n=5$)

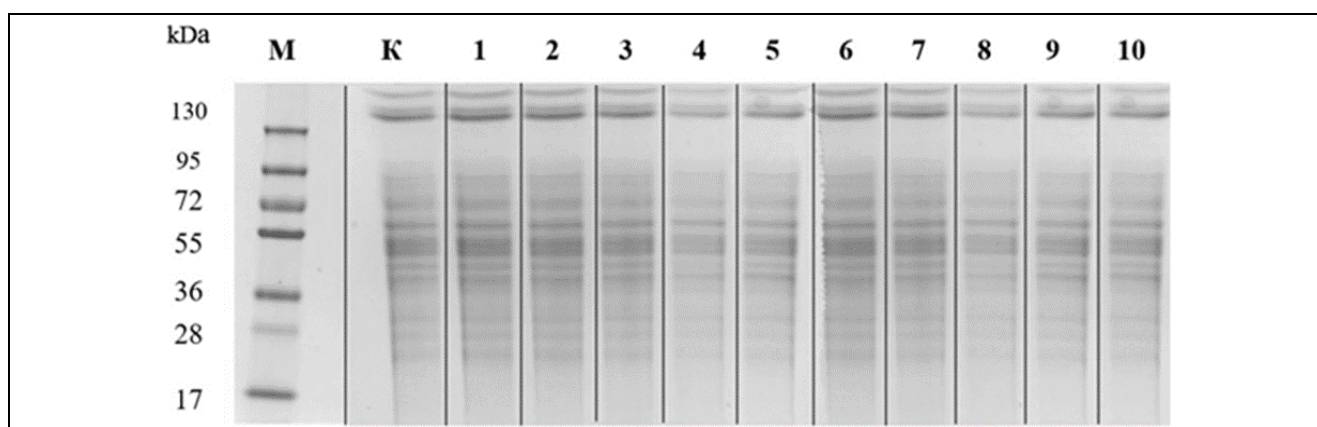


Рис. 5. Электрофореграмма белков, окраска Кумаси: К – контроль, 1 – Рц, 2 – Ац, 3 – ППц, 4 – Рвм, 5 – Авм, 6 – ППвм, 7 – Рц-Рвм, 8 – Ац+Авм, 9 – ППц+ППвм, 10 – контроль (флавитал)



Рис. 6. Показатели активности утилизации *E. coli* углеводного компонента среды: К – контроль (аскорутин), а – Рц, б – Ац, в – ППц, г – Рвм, д – Авм, е – ППвм, ж – Рц-Рвм, з – Ац+Авм, и – ППц+ППвм, к – контроль (флавитал) ($\bar{x} \pm I_{95}$, $n=5$)

В эксперименте с клиническим изолятом *E. coli* та же группа препаратов оказывает аналогичное действие на показатели утилизации источника углерода. В эксперименте с рутином из цветков гречихи расход субстрата снизился на 20,9%, удельная активность β-галактозидазы на 35,9%; с антоцианами из вегетативной массы гречихи – на 37,8 и 45,3% соответственно. Эти показатели коррелируют с $r=0,98$ ($p < 0,05$) (рис. 6).

Известно, что соединения растительного происхождения имеют как антиоксидантную активность, так и способны выступать в качестве прооксидантов, в особых условиях генерируя активные формы кислорода. Оценка системы антиоксидантной защиты показала резкое повышение удельной активности супероксиддисмутазы и каталазы в эксперименте с антоцианами из вегетативной массы гречихи (рис. 7).

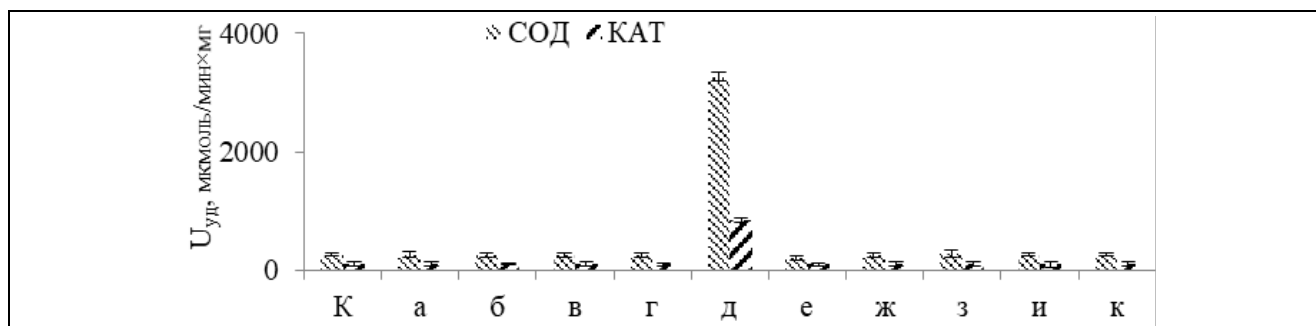


Рис. 7. Показатели активности ферментов антиоксидантной защиты *E. coli*: К – контроль, а – Rc, б – Ac, в – PPц, г – Pvm, д – Avm, е – PPvm, ж – Rc-Pvm, з – Ac+Avm, и – PPц+PPvm, к – контроль (флавитал) ($\bar{x} \pm I_{95}$, n=5)

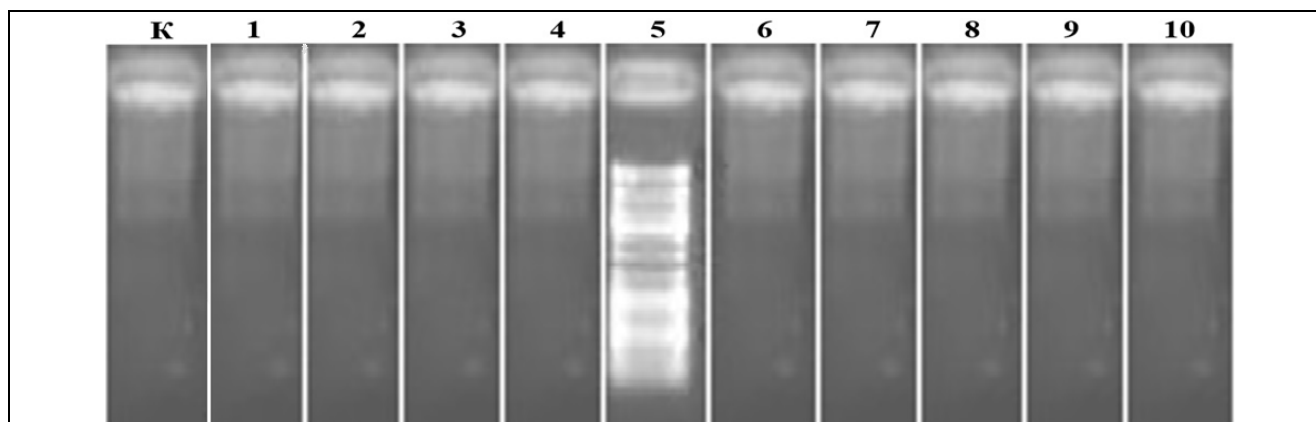


Рис. 8. Электрофореграмма ДНК *E. coli*: К – контроль, 1 – Rc, 2 – Ac, 3 – PPц, 4 – Pvm, 5 – Avm, 6 – PPvm, 7 – Rc-Pvm, 8 – Ac+Avm, 9 – PPц+PPvm, 10 – контроль (флавитал)

Превышение показателей супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ) интактной культуры составило в 12,8 и 8,37 раз соответственно, в абсолютных цифрах 3270,5 и 841,3 мкмоль/мин×мг ($p < 0,05$). Прочие образцы из тестируемой группы повышали активность ферментов в пределах 0,8–1,6%. Показатели СОД и КАТ снижались при совместной инкубации с полифенольными препаратами на 7,8 и 4,6% ($p < 0,05$), что говорит об их антиоксидантной активности при заданной концентрации в среде. Также известно, что препараты биогенных фенолов способны к цитотоксическому действию за счет образования разрывов цепей ДНК. Препарат антоцианов из вегетативной массы гречихи – единственный образец, оказавший влияние на целостность ДНК бактерии. На электрофореграмме наблюдается фрагментация молекулы, в виде «лестницы» (рис. 8).

Можно предположить, что антоцианы индуцируют окислительный стресс, в следствии чего и наблюдается подобный всплеск активности системы антиоксидантной защиты *E. coli*. Однако адаптивный эффект такого уровня оказался недостаточен, что в последствии привело накоплению ак-

тивных форм кислорода и деструкции ДНК, за счет прямого воздействия на молекулу.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований выявлено, что полифенольный комплекс гречихи посевной обладает биологической активностью в отношении условно-патогенных микроорганизмов и фитопатогенов. Полученные данные свидетельствуют, что в представленной подборке исследуемых флавоноидов гречихи и препаратов на их основе отмечается четкое разделение по специфичности действия: рутин, антоцианы из цветков гречихи эффективно угнетают рост условно-патогенных бактерий и проявляют слабый бактериостатический эффект в отношении фитопатогенных возбудителей.

Полифенольные препараты из цветков и вегетативной массы гречихи обладают слабой бактериостатической активностью в отношении условно-патогенной и фитопатогенной микрофлоры. Данный факт объясняется невысокой концентрацией рутина, нивелирующей бактериостатический эффект сопутствующих флавоноидных компонентов.

В отношении клинического изолята *E. coli* рутин и антоцианы гречихи проявляют выраженный бактериостатический эффект и за счет прооксидантного эффекта, показывают симметричность направленности биологического действия, нарушая в том числе и функциональный статус клеточной стенки *E. coli*. Компонента полифенольного комплекса гречихи – рутин и антоцианы также способствуют снижению адгезивности, протеазной активности, уменьшению уровня потребления углеводного субстрата, снижению удельной активности β -галактозидазы в опытах с изолятом *E. coli*.

Эффективная концентрация препаратов, содержащих флавоноиды, будет токсична для млекопитающих, что исключает их применение внутрь, но оставляет в перспективе возможным использование в качестве биологически активных компонентов антисептических растворов для наружного применения. Кроме этого, перспективность использования флавоноидов гречихи в практике обусловлено и относительной дешевизной получения экстрактов и препаратов на их основе, и большой распространенностью этих полифенолов в окружающей среде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Солёнова Е.А., Николаевна Величковска Л.Н. Флавоноиды. Перспективы применения в антимикробной терапии. *Acta medica Eurasica*. 2017; 3: 50–57.
2. Запроматов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: 1993; 119 с.
3. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Муфазаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицины. Пушкино: Synchrobook, 2013; 310 с.
4. Kinoshita T., Lepp Z., Kawai Y., et al. An intergrated database of flavonoids. *Biofactors*. 2006; 26(3): 179–188.
5. Тутельян В.А., Батуринов А.К., Мартинчик Э.А. Флавоноиды: содержание в пищевых продуктах, уровень потребления, биодоступность. *Вопросы питания*. 2004; 73(6): 43–48.
6. Кравченко Л.В., Морозов С.В., Авреньева Л.И. Оценка антиоксидантной и антиоксической эффективности природного флавоноида дигидрокверцетина. *Токсикологический вестник*. 2005; 1: 14–15.
7. Шульпекова Ю.О. Флавоноиды расторопши пятнистой в лечении заболеваний печени. *Русский медицинский журнал*. 2004; 12(5): 248–250.
8. Азарова О.В., Галактионова Л.П. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия. *Химия растительного сырья*. 2012; 4: 61–78.
9. Евстропов А.Н., Бурова А.Г., Орловская И.А. и др. Противозентеровирусная и иммуностимулирующая активность полифенольного комплекса, экстрагированного из пятилистника кустарникового (*Penthaphylloides fruticosa* L.). *Вопросы вирусологии*. 2004; 49(6): 30–33.
10. Perez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: Effect of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res*. 2006; 40(10): 1054–1065.
11. Aqil F., Ahmad I., Owais M. Evalition of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity and synergy of some bioactive plant extracts. *Biotechnol. J.* 2006; 1(10): 1093–1102.
12. Дейнека В.И., Хлебников В.А., Чулков А.Н., Дейнека Л.А., Перистый В.А., Сорокопудов В.Н. Антоцианы и алкалоиды: особенности сорбции природными глинистыми минералами. *Химия растительного сырья*. 2007; 2: 63–66.
13. Дейнека В.И., Макаревич С.Л., Дейнека Л.А. и др. Антоцианы плодов некоторых видов боярышника (*Crataegus* L. Rosaceae). *Химия растительного сырья*. 2014; 1: 119–124.
14. Писарев Д.И., Новиков О.О., Селютин О.А., Писарева Н.А. Биологическая активность полифенолов растительного происхождения перспектива использования антоцианов в медицинской практике. *Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация*. 2012; 10(129): 17–22.
15. Гнеушева И.А., Солохина И.Ю. Оценка антифунгальных и ростостимулирующих свойств биопрепаратов на основе природных компонентов. *Вестник ИрГСХА*. 2020; 99: 31–39.
16. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. МУК 4.2.1890-04. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004; 91 с.
17. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. *Лабораторное дело*. 1986; 4: 210–212.
18. Craven G.R., Steers E. (Jr.), Anfinsen C.B. Purification, composition and molecular weight of the β -galactosidase *E. coli* K – 12. *J. Biol. Chem*. 1965; 240(6): 2468–2477.
19. Anson M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen Physiol*. 1938; 22(1): 79–89.
20. McCord J.M. Superoxide dismutase. *The J. of Biol. Chem*. 1969; 244(22): 6049–6055.
21. Beers R.F. (Jr.), Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem*. 1952; 195(1): 133–140.
22. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 1956; 28(2): 350–356.
23. Вешняков В.А., Хабаров Ю.Г., Камакина Н.Д. Сравнение методов определения редуцирующих веществ: метод Бертраана, эбулиостатический и фотометрический методы. *Химия растительного сырья*. 2008; 4: 47–50.
24. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72: 248–254.
25. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2008; 67 с.
26. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680–685.
27. Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Лушиников А.В. Антибактериальные эффекты БАВ различного происхождения и их сочетанного действия с некоторыми β -лактамами антибиотиками. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2019; 1: 52–59. doi: 10.26155/vet.zoo.bio.201901008.

Поступила после доработки 13 марта 2022 г.

BIOLOGICAL EFFECTS OF BUCKWHEAT FLAVONOIDS

© Authors, 2022

I.A. Gneusheva

Ph.D. (Eng.), Associate Professor, Department of Biotechnology,
Oryol State Agrarian University named after N.V. Parakhin (Orel, Russia)
E-mail: obc1-2010@mail.ru

I.Yu. Solokhina

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Department of Biotechnology,
Oryol State Agrarian University named after N.V. Parakhin (Orel, Russia)
E-mail: solohinairina@yandex.ru

A.V. Lushnikov

Chief Specialist, Center for Collective Use "Oryol Regional Center for Agricultural Biotechnology",
Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhina (Orel, Russia)
E-mail: alex_de-vil@mail.ru

Buckwheat flavonoids are represented by a wide range of biologically active substances of polyphenolic nature. Rutin and buckwheat anthocyanins have the greatest biological activity.

Purpose of the study. Evaluation of the biological effects of the polyphenolic complex of buckwheat.

Material and methods. Rutin, anthocyanins, a preparation of polyphenolic nature isolated from flowers and vegetative mass of buckwheat were used as objects of research. Sensitivity to antibiotic drugs and the minimum inhibitory concentration were determined by the disco-diffusion method and the method of serial dilutions. Osmotic resistance of *E. coli* was evaluated densitometrically with varying concentrations of NaCl. Adhesive activity was determined by the number of bacterial cells attached to erythrocytes. The activity of β -galactosidase was determined by the change in optical density at a wavelength of 405 nm. Protease activity was analyzed by incubating a biomaterial with trichloroacetic acid, followed by the calculation of activity according to the calibration curve with tyrosine. The activity of the superoxide dismutase enzyme was determined by spectrophotometry at a wavelength of 550 nm, and the activity of catalase at a wavelength of 240 nm.

The carbohydrate content was determined by reaction with phenol in the presence of sulfuric acid at a wavelength of 440 nm. The quantitative content of reducing substances was determined by Veshnyakov. The peptone content was quantified by reaction with a biuretic reagent. The total protein content in the biomass was determined by Bradford. Protein analysis by electrophoresis in polyacrylamide gel under denaturing conditions.

Results. A study of the antibiotic activity of buckwheat flavonoids and preparations based on them was conducted, the minimum concentrations of rutin and anthocyanins from buckwheat flowers were established - 6.13 and 2.62 mcg/ml, respectively, which inhibit the growth of *E. coli* bacteria ATCC 25922. When co-incubating β -lactam antibiotics with buckwheat flavonoids, it was found that the active components rutin from flowers and anthocyanins from the vegetative mass of buckwheat reduce the minimum inhibitory concentration of amoxicillin by an average of 34-36%, meropenem by 20-22%, cefazolin by 16-18%. According to the results of the study of the effect of buckwheat flavonoids on osmotic resistance and adhesion of *E. coli*, it was shown that rutin from buckwheat flowers caused an effective decrease in these indicators. The activity indicators of *E. coli* peptone utilization, as well as the specific activity of proteases decreased under the action of rutin and anthocyanins. Phenolic compounds - rutin and anthocyanins contribute to a decrease in the utilization of carbohydrate components and the specific activity of β -galactosidase during co-incubation with isolate *E. coli*. Anthocyanins from the vegetative mass of buckwheat have antioxidant activity, causing a significant increase in the activity of superoxide dismutase and catalase.

Conclusions. When studying the biological properties of buckwheat flavonoids, the specificity of the action of their component composition was established. The most active compounds of the polyphenolic complex of buckwheat have been identified - rutin from flowers and anthocyanins from vegetative mass, which have bacteriostatic activity against *E. coli*, due to prooxidant action and violation of the integrity of the bacterial cell wall. In addition, rutin and anthocyanins exhibit a weak bacteriostatic effect against phytopathogenic pathogens. Buckwheat anthocyanins, inducing oxidative stress, subsequently cause a violation of the integrity of *E. coli* DNA. Compounds of the phenolic complex of buckwheat with pronounced biological activity can be recommended as components for the creation of antiseptic solutions for external use.

Key words: buckwheat, flavonoids, rutin, anthocyanins, *E. coli*, adhesion, electrophoresis, β -galactosidase, protease activity, superoxide dismutase, catalase.

For citation: Gneusheva I.A., Solokhina I.Yu., Lushnikov A.V. Biological effects of buckwheat flavonoids. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(6):28-39. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-06-04>

REFERENCES

1. Soljonova E.A., Nikolaevna Velichkovska L.N. Flavonoidy. Perspektivy primeneniya v antimikrobnoy terapii. Acta medica Eurasica. 2017; 3: 50-57.
2. Zaprometov M.N. Fenol'nye soedineniya: rasprostraneniye, metabolism i funkcii v rasteniyah. M.: 1993; 119 s.
3. Tarahovskij Ju.S., Kim Ju.A., Abdrasilov B.S., Mufazarov E.N. Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, mediciny. Pushhino: Synchronbook, 2013; 310 s.
4. Kinoshita T., Lepp Z., Kawai Y., et al. An integrated database of flavonoids. Biofactors. 2006; 26(3): 179-188.

5. Tutel'jan V.A., Baturin A.K., Martinchik Je.A. Flavonoidy: sodержanie v pishhevyyh produktah, uroven' potreblenija, biodostupnost'. Voprosy pitaniya. 2004; 73(6): 43-48.
6. Kravchenko L.V., Morozov S.V., Avren'eva L.I. Ocenka antioksidantnoj i antitoksicheskoj jeffektivnosti prirodno go flavonoida digidrokvercetina. Toksikologicheskij vestnik. 2005; 1: 14-15.
7. Shul'pekova Ju.O. Flavonoidy rastropshi pjatnistoj v lechenii zabolevanij pečeni. Russkij medicinskij zhurnal. 2004; 12(5): 248-250.
8. Azarova O.V., Galaktionova L.P. Flavonoidy: mehanizm protivovospalitel'nogo dejstvija. Himija rastitel'nogo syr'ja. 2012; 4: 61-78.
9. Evstropov A.N., Burova A.G., Orlovskaja I.A. i dr. Protivojenterovirusnaja i immunostimulirujushhaja aktivnost' polifenol'nogo kompleksa, jekstragirovannogo iz pjatilistnika kustarnikovogo (*Pentaphylloides fruticosa* L.). Voprosy virusologii. 2004; 49(6): 30-33.
10. Perez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantsitohaina R. Endothe-lial function and cardiovascular disease: Effect of quercetin and wine polyphenols. Free Radic Res. 2006; 40(10): 1054-1065.
11. Aqil F., Ahmad I., Owais M. Evalition of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity and syner-gy of some bioactive plant extracts. Biotechnol. J. 2006; 1(10): 1093-1102.
12. Dejneka V.I., Hlebnikov V.A., Chulkov A.N., Dejneka L.A., Peristyj V.A., Sorokopudov V.N. Antociany i alkaloidy: osobennosti sorbcii prirodnymi glinistymi mineralami. Himija rastitel'nogo syr'ja. 2007; 2: 63-66.
13. Dejneka V.I., Makarevich S.L., Dejneka L.A. i dr. Antociany plodov nekotoryh vidov bojarjshnika (*Crataegus* L. Rosaceae). Himija rastitel'nogo syr'ja. 2014; 1: 119-124.
14. Pisarev D.I., Novikov O.O., Seljutin O.A., Pisareva N.A. Biologicheskaja aktivnost' polifenolov rastitel'nogo proishozhdenija perspektiva ispol'zovanija antocianov v medicinskoj praktike. Nauchnye vedomosti. Serija Medicina. Farmacija. 2012; 10(129): 17-22.
15. Gneusheva I.A., Solohina I.Ju. Ocenka antifungal'nyh i rostostimulirujushhih svojstv biopreparatov na osnove prirodnih komponentov. Vestnik IrGSHA. 2020; 99: 31-39.
16. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.2.1890-04. M.: Federal'nyj centr gossanjepidnadzora Minzdrava Rossii, 2004; 91 s.
17. Brilis V.I., Brilene T.A., Lencner H.P., Lencner A.A. Metodika izucheniya adgezivnogo processa mikroorganizmov. Laboratornoe delo. 1986; 4: 210-212.
18. Craven G.R., Steers E. (Jr.), Anfinsen C.B. Purification, com-position and molecular weight of the β -galactosidase *E. coli* K - 12. J. Biol. Chem. 1965; 240(6): 2468-2477.
19. Anson M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. J. Gen Physiol. 1938; 22(1): 79-89.
20. McCord J.M. Superoxide dismutase. The J. of Biol. Chem. 1969; 244(22): 6049-6055.
21. Beers R.F. (Jr.), Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 1952; 195(1): 133-140.
22. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956; 28(2): 350-356.
23. Veshnjakov V.A., Habarov Ju.G., Kamakina N.D. Sravnenie metodov opredelenija reducirujushhih veshhestv: metod Bertrana, jebuliostaticeskij i fotometriceskij metody. Himija rastitel'nogo syr'ja. 2008; 4: 47-50.
24. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.
25. Metody kontrolja bakteriologicheskikh pitatel'nyh sred: Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.2.2316-08. M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora. 2008; 67 c.
26. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
27. Gneusheva I.A. Pavlovskaja N.E., Lushnikov A.V. Antibakterial'nye jeffekty BAV razlichnogo proishozhdenija i ih sochetannogo dejstvija s nekotorymi β -laktamnymi antibiotikami. Veterinarija, zootehnija i biotehnologija. 2019; 1: 52-59. doi: 10.26155/vet.zoo.bio.201901008.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Хелепин (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспециды копеечниковой (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.).

Хелепин Д (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru