

*На правах рукописи*

**Мартьянов Сергей Владиславович**

**ВОЗМОЖНОСТИ УПРАВЛЕНИЯ ФОРМИРОВАНИЕМ И  
ФУНКЦИОНИРОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК НА  
ПРИМЕРЕ ХЕМОГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАЗНЫХ  
ЭКОТОПОВ**

Специальность 03.02.03 – Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва – 2021**

Работа выполнена в лаборатории нефтяной микробиологии и в лаборатории выживаемости микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Научный руководитель:** **Плакунов Владимир Константинович,**  
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Официальные оппоненты:** **Дерябин Дмитрий Геннадьевич,**  
доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, лаборатории селекционно-генетических исследований в животноводстве Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук».

**Плюта Владимир Александрович,**  
кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева», факультет биотехнологии и промышленной экологии.

Защита состоится 23 июня 2021 года в 11-00 на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИЦ Биотехнологии РАН по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года

**Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук**

Хижняк Татьяна Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Микробные биопленки представляют собой основную форму существования микроорганизмов в природе. Понятие об отдельном биопленочном фенотипе окончательно сложилось к концу 70-х годов прошлого столетия (Costerton, 1978). К настоящему моменту детально изучены стадии формирования биопленок для ряда модельных микроорганизмов, например, псевдомонад. Микроорганизмы в составе биопленок являются причиной большинства хронических инфекций, вызывают повреждение технологического оборудования и медицинского инструментария. По этой причине наиболее актуальной является борьба с нежелательным формированием микробных биопленок. Она включает в себя (1) модификацию поверхностей для защиты от нежелательного обрастания, (2) применение химических ингибиторов для борьбы с формирующимися и зрелыми биопленками и (3) механическое или ферментативное удаление зрелых биопленок с поверхности, например, при помощи ультразвука или гидролитических ферментов. Ко второй группе подходов относится как традиционная терапия антибиотиками (зачастую, в очень высоких концентрациях), так и применение новых антибиопленочных агентов, например, ингибиторов бактериальной системы quorum sensing. Настоящая работа посвящена детальному изучению механизмов действия антибиопленочных веществ в рамках второго подхода.

Актуальной проблемой является также и стимуляция роста биопленок для использования их в практических целях, поскольку микробные биопленки находят широкое применение в биотехнологии (Ножевникова с соавт., 2015). Наиболее перспективной стратегией для решения указанных задач является поиск соединений-модуляторов роста биопленок, включающей как разработку и внедрение новых препаратов, так и применение уже известных соединений в новом качестве. К настоящему моменту выполнено большое число исследований, посвященных поиску новых антибиопленочных, и, в меньшей степени, пробиопленочных агентов, как среди традиционных антибиотиков и их комбинаций, так и среди новых соединений, например, вторичных метаболитов растений (Jakobsen et al., 2012), литических ферментов (Nijland et al., 2010; Shields et al., 2013), полисахаридов (Diaz De Rienzo et al., 2016), гормонов животных (Lesouhaitier et al., 2019).

В связи с этим наиболее перспективным представляется поиск потенциальных модуляторов роста биопленок среди соединений, уже применяемых в клинической практике или пищевой промышленности. Настоящая работа посвящена поиску потенциальных ингибиторов и стимуляторов роста биопленок модельных бактерий среди традиционных, широко применяемых соединений. Данный подход не требует затратных испытаний, и позволит ускорить срок внедрения новых соединений в клиническую практику.

## **Цель и задачи исследования**

Целью настоящего исследования является изучение процессов управления формированием и биологической активностью микробных биопленок, включающее поиск широкодоступных агентов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Поиск потенциальных анти-, и пробиопленочных агентов в отношении модельных микроорганизмов среди традиционных биоцидов, пищевых консервантов и растворителей.
2. Изучение антибиопленочного действия (в том числе в сочетании с антибиотиком азитромицином) отобранных соединений, а также влияния на бактериальную систему *quorum sensing*.
3. Оценка антибиопленочной активности 1280 соединений из коммерческой библиотеки Prestwick Chemical Library в отношении модельного штамма *Escherichia coli* K12 W3110. Изучение механизма действия наиболее эффективного ингибитора (ов), а также их эффективности в отношении уропатогенных штаммов *E. coli*.

## **Научная новизна и значимость работы**

Впервые удалось устранить стимулирующее действие сверхнизких концентраций антибиотика азитромицина при помощи традиционных консервантов и лекарственных препаратов (4-гексилрезорцина, никлозамида, сульфатаиазола) на формирование бактериальных биопленок, что позволяет наметить пути борьбы с возникновением хронических инфекций при антибиотикотерапии. Предложен новый подход к применению широко используемых традиционных консервантов и лекарственных веществ в качестве модуляторов роста биопленок. Впервые показан антибиопленочный эффект 4-гексилрезорцина в отношении модельных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также синергидный ингибиторный эффект данного соединения в сочетании с антибиотиком азитромицином. Впервые показана возможность использования антигельминтного препарата никлозамида как антибиопленочного агента в отношении биопленок ряда модельных микроорганизмов из разных экотопов, а также эффективность данного ингибитора в сочетании с азитромицином. Обнаружен антибиопленочный эффект и изучен механизм ингибирующего действия клиохинола на биопленки *E. coli*, а также активность сульфатаиазола в качестве антибиопленочного агента. Изучен пробиопленочный стимулирующий эффект никлозамида на синтез антибиотиков-феназинов в биопленках *P. aeruginosa*, а также стимуляция диметилсульфоксидом синтеза широко изучаемого ингибитора роста микроорганизмов и опухолевых клеток виолацеина в биопленках *C. violaceum*.

## **Практическая значимость**

Полученные данные позволяют разработать рекомендации для применения исследуемых соединений в экспериментах *in vivo* в качестве антибиопленочных агентов. В частности, возможно создание комбинированных препаратов на их основе в сочетании с антибиотиками различного спектра действия для ингибирования роста

биопленок на поверхности катетеров, предотвращения возникновения процессов патогенеза в ротовой полости. Доказанная эффективность нескольких препаратов из библиотеки Prestwick Chemical Library против биопленок уропатогенных штаммов *E. coli* делает возможным их применение для лечения и профилактики инфекций урогенительного тракта. Использование диметилсульфоксида для стимуляции синтеза виолацеина и никлозамида для стимуляции синтеза антибиотиков-феназинов перспективно для совершенствования биотехнологии производства указанных соединений.

### **Апробация работы**

Материалы научно-квалификационной работы были представлены на 19-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века (Пушино, Россия, 2015), X Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2015), международной конференции «Antimicrobial resistance in microbial biofilms and options for the treatment» (Гент, Бельгия, 2016), 1-го Российского микробиологического конгресса (Пушино, Россия, 2017).

### **Публикации**

По результатам исследований автором опубликовано 15 научных работ, в том числе, 7 статей в ведущих рецензируемых научных журналах из перечня ВАК при Министерстве образования и науки РФ, индексируемых Web of Science, и 8 тезисов конференций.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работы, таких как планирование и постановка экспериментов, статистическая обработка данных анализ и оформление результатов, апробация основных положений на различных конференциях, написание статей

### **Структура и объем работы**

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и включает 31 рисунок и 5 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы, который содержит 236 наименований.

### **Место проведения работы и благодарности**

Работа выполнена с 2014 по 2018 годы в лаборатории нефтяной микробиологии и в лаборатории выживаемости микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, а также во время стажировки в Центре Синтетической Микробиологии на базе Института наземной микробиологии Общества Макса Планка, Германия.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.б.н., профессору Плакунову Владимиру Константиновичу за поддержку и внимание на всех этапах работы. Автор благодарен сотрудникам лаборатории выживаемости микроорганизмов: к.б.н. Ганнесену А.В., к.б.н. Журиной М.В. за помощь в проведении экспериментов и моральную поддержку, а также сотрудникам

лаборатории нефтяной микробиологии к.б.н. Тарасову А.Л (посмертно), к.г-м.н. Борзенкову И.А. за помощь в работе с коллекционными штаммами.

Автор благодарит доктора философии, профессора, директора Центра Системной и Синтетической микробиологии (Synmikro) Виктора Суржика, д.б.н., профессора кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова Александра Ивановича Нетрусова за предоставление возможности стажировки, помощь в её организации, руководство и консультации. Автор благодарен коллективу Центра Системной и Синтетической микробиологии: доктору философии Леаниду Лаганенке за предоставление штаммов, инженеру Йоргу Канту и доктору философии Тимо Глаттеру за помощь и руководство в проведении протеомных исследований, инженеру Сильвии Гонзалес-Сьерра за помощь в проведении проточной цитометрии, доктору философии Габриэлю Маленго за помощь и обучение конфокальной микроскопии, аспирантам Марии Эстебан, Франсиско Диас-Паскалю, доктору философии Ю Чену, доктору философии Ольге Лампрехт, доктору философии Ярославу Руденко, доктору философии Бартошу Тырковиду, доктору философии Джинг Юань за помощь в работе, ценные советы и моральную поддержку. Автор выражает глубокую признательность аспирантке Synmikro Наталии Тетеновой за плодотворное сотрудничество и новые научные идеи.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили модельные сапротрофные микроорганизмы, полученные из коллекции Института микробиологии РАН, а также из коллекции Центра Синтетической Микробиологии, Германия, и лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов, ИМГ РАН. Критериями для выбора модельных объектов служили: (1) способность образовывать детектируемые биопленки, (2) фенотипическая близость к патогенным микроорганизмам. В качестве модельных бактерий были использованы грамположительные бактерии *Kocuria rhizophila* DC2201, *Dietzia natronolimnaea* 2610-1, *Rhodococcus equi*, *Kytococcus schroeteri* H01, *Staphylococcus aureus* MFP03, *S. aureus* 209P и *Micrococcus luteus* C01 из коллекции лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН, грамотрицательные бактерии из коллекции ИМГ РАН *Chromobacterium violaceum* CV WT, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (а также мутантные штаммы *C. violaceum* CV026 и *P. aeruginosa* PAO1 6863, неспособные к синтезу ацилгомосеринлактонов), *P. chlororaphis* 66, *P. chlororaphis* 449, модельный штамм *Escherichia coli* K12 W3110 и полученные трансформанты *E. coli* K12 W3110/pVS1621, *E. coli* K12 W3110/pVS1157, а также уропатогенные штаммы *E. coli* EcoR-50, *E. coli* DSMZ 10650 из коллекции Synmikro.

### Используемые модуляторы роста биопленок

**4-гексилрезорцин (4-ГР).** Представитель класса алкилоксибензолов (АОБ), служащих регуляторными бактериальными автоиндукторами, ответственными за регуляцию множества процессов в клетке (Николаев с соавт., 2006). Используется в качестве пищевого консерванта E586. Оказывает синергидный антимикробный

эффект совместно с антибиотиками различного спектра действия (Nikolaev et al., 2020).

**Никлозамид.** Салициланилидный препарат: противогельминтное средство и моллюскицид. Другие коммерческие названия: фенасал, мансонил, линтекс, йомезан, фенадек, феналидон. В последнее время появилось множество сообщений о его противораковом эффекте (Sack et al., 2011; Pan et al., 2012; Stewart et al., 2016).

**Prestwick Chemical Library.** Библиотека препаратов, включающая 1280 соединений (Prestwick Chemical), одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA), различного спектра действия. Содержит по 100 мкл каждого соединения, растворенного в ДМСО в концентрации 10 М.

**Сульфатиазол (СТЗ)** – один из наиболее известных представителей сульфаниламидов. Высказано предположение об ингибировании им бактериальных цд-ГМФ-зависимых систем (Antoniani et al., 2010).

**Азитромицин.** Полусинтетический макролидный антибиотик широкого спектра действия. Ингибитор белкового синтеза за счет связывания с 50S субчастицей рибосомы. Обладает некоторой активностью при терапии антибиопленочных инфекций. В настоящей работе предметом изучения в основном являлся его пробиопленочный эффект, вызванный субингибиторными концентрациями, а также антибиопленочный эффект при высоких концентрациях этого антибиотика.

**Диметилсульфоксид (ДМСО).** Находит широкое применение как органический растворитель. Используется также в косметике. В настоящей работе обнаружена способность ДМСО (99.99%, АО «ЭКОС-1», Россия; ООО «Паритекс», Россия) служить индуктором синтеза виолацеина в биопленках хромобактерий.

Чувствительность микроорганизмов в биопленках и планктонной культуре к исследуемым биоцидам оценивали по ингибирующей дозе, подавляющей рост на 50 % (ИД<sub>50</sub>). Для сравнения чувствительности планктонных культур и биопленок к антибактериальным веществам и физико-химическим факторам среды использовали разработанный в лаборатории **метод тефлоновых кубиков** (Стрелкова с соавт., 2012; Плакунов с соавт., 2016). Кратко – рост планктонной культуры оценивали по условной оптической плотности при  $\lambda=540$  нм. Биопленки, выращенные на поверхности тефлоновых кубиков, отмывали от остатков планктонной культуры и окрашивали 0.1% водным раствором красителя кристаллического фиолетового (КФ). Для окрашивания внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) биопленок использовали краситель 1,9-диметилметиленовый синий (1.9-dimethylmethylen blue, ДММВ) по модифицированной методике (Peeters et al., 2008): сухую навеску красителя из расчета 160 мкг/мл растворяли в буфере (200 мг формиата натрия + 200 мг конц. муравьиной кислоты на 100 мл воды, рН 3.0). КФ экстрагировали 96% этанолом, а ДММВ декомплексирующим раствором (1.64 г ацетата натрия + 152.85 г гуанидин-хлорида + 40 мл изопропанола на 400 мл воды, рН 6.8). Оптическую плотность экстрактов измеряли при 590 нм (в случае КФ) или при 670 нм (для ДММВ).

Для изучения роста биопленок без равновесия с планктонной культурой использовали оригинальный **метод оценки метаболической активности клеток в биопленках на фильтрах из стекловолокна**. Бумагу из стекловолокна (GF/F, Whatman) нарезали на квадраты размером 2 × 2 см, стерилизовали их при 1 ати и стерильно накладывали на поверхность плотной питательной среды LB в чашках Петри. Жизнеспособность клеток определяли методом окрашивания биопленок, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ, Плакунов с соавт., 2016). МТТ – это метаболизируемый краситель, служащий акцептором электронов от НАДН в НАДН-дегидрогеназных реакциях в клетке (Berrige, Tan, 1993). При восстановлении МТТ превращается в нерастворимый в воде формазан, количество которого служит маркером метаболической активности. Связанный формазан экстрагировали ДМСО в течение суток. Оптическую плотность экстракта измеряли при  $\lambda=590$  нм.

В ряде случаев (для работы со штаммами *E. coli*, *S. violaceum*) использовали классический **метод выращивания биопленок в лунках иммунологических планшетов**. При необходимости биопленки фиксировали 96% этанолом, окрашивали КФ, и измеряли оптическую плотность экстрактов в 96 % этаноле при  $\lambda=590$  нм на анализаторе TECAN 200 PRO.

Для измерения интенсивности флуоресценции биопленочных клеток репортерных штаммов *E. coli* W3110 использовали **метод проточной цитометрии**. Конструирование штаммов проводили **трансформацией методом теплового шока** по стандартному протоколу. Выращенные в 8-луночных пластиковых планшетах (ibidi GmbH) биопленки полученных трансформантов диспергировали в 400 мкл фосфатного буфера. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин при 4500 об/мин, осадок ресуспендировали в течение 1 мин на смесителе «Вортекс» для разрушения всех межклеточных агрегатов. Суспензию разводили фосфатным буфером в 20 раз, после чего проводили измерение на проточном цитофлуориметре BD LSRIIFortessa SORP.

Исследование тотального протеома проводили **методом масс-спектрометрии по принципу орбитальной ионной ловушки (Orbitrap)** под руководством доктора Тимо Глаттера (Timo Glatter) на базе Института им. Макса Планка. Подготовка образцов проводилась совместно с инженером-исследователем Йоргом Кантом (Jörg Kahnt), им же полностью проводилось получение спектров и первичная обработка данных. Статистическая обработка была проведена с любезной помощью доктора Тимо Глаттера.

**Антиворумную активность никлозамида оценивали с использованием биосенсорного штамма *S. violaceum* CV026**. Метод основан на способности штамма CV026 образовывать фиолетовый пигмент виолацеин при наличии экзогенных ацилгомосеринлактонов (АГЛ) в среде. В чашки Петри диаметром 10 см с плотной агаризованной средой LB добавляли 10 мл полужидкой среды LB (0.5 % агара), предварительно разведенной в 2 раза суточной культурой мутантного штамма *S.*



*violaceum* CV026, выращенной на жидкой среде LB с добавлением канамицина (40 мкг/мл). После застывания полужидкой среды вырезали сквозные лунки в толще агара прокаленным в пламени горелки пробочным сверлом диаметром 5 мм. В лунки вносили по 100 мкл исследуемого раствора. После инкубации визуально оценивали диаметр зон подавления роста, а также диаметр зоны ингибирования системы quorum sensing (QS) (неокрашенный бактериальный газон на окрашенном виолацеином фоне).

Для **определения биосинтеза феназинов штаммами *P. aeruginosa*** культуру выращивали в колбах на качалке (150 об/мин) при 300С. Пробы отбирали ежедневно в течение трех суток. Клетки отделяли путем 15-минутного центрифугирования при 5500 g. В связи с тем, что разные феназины различаются по положению максимумов поглощения в их спектрах, оптическую плотность полученного супернатанта измеряли при длинах волны 315 и 340 нм против стерильной среды LB. Параллельно для измерения роста культуры измеряли условную оптическую плотность при 540 нм

Для изучения влияния никлозамида на синтез феназинов в биопленках клетки выращивали на фильтрах из стекловолокна на поверхности агаризованной среды LB. После культивации фильтры снимали со среды и окрашивали МТТ, а среду извлекали из чашки, расплавляли и измеряли её оптическую плотность при 315 и 340 нм.

Для **выделения пиоцианина из культуральной жидкости *P. aeruginosa*** клетки отделяли от среды 15-минутным центрифугированием на холоду при 5500g. Полученный супернатант помещали в делительную воронку и проводили экстракцию пиоцианина хлороформом. Из хлороформного экстракта пигмент экстрагировали 0.2 М HCl. При этом пиоцианин меняет цвет с голубого на розовый. Затем добавляли 1М NaOH до возвращения голубой окраски и повторно экстрагировали хлороформом. После этого растворитель выпаривали. Полученный очищенный продукт хранили при температуре -18°C

**Тонкослойную хроматографию** проводили на пластиковых пластинках с силикагелем (HPTLC, für die Nano-DC, MERCK). В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформа и метанола в пропорциях 9:1 (Filloux, Ramos, 2014). Разделенные пигменты элюировали метанолом и также хранили при температуре -18°C.

Продуктивность штаммов по феназинам выражали в условных единицах. Для расчета условных единиц величину оптической плотности супернатанта при 315 нм (максимум поглощения большинства феназинов) делили на величину оптической плотности экстракта МТТ при 590 нм.

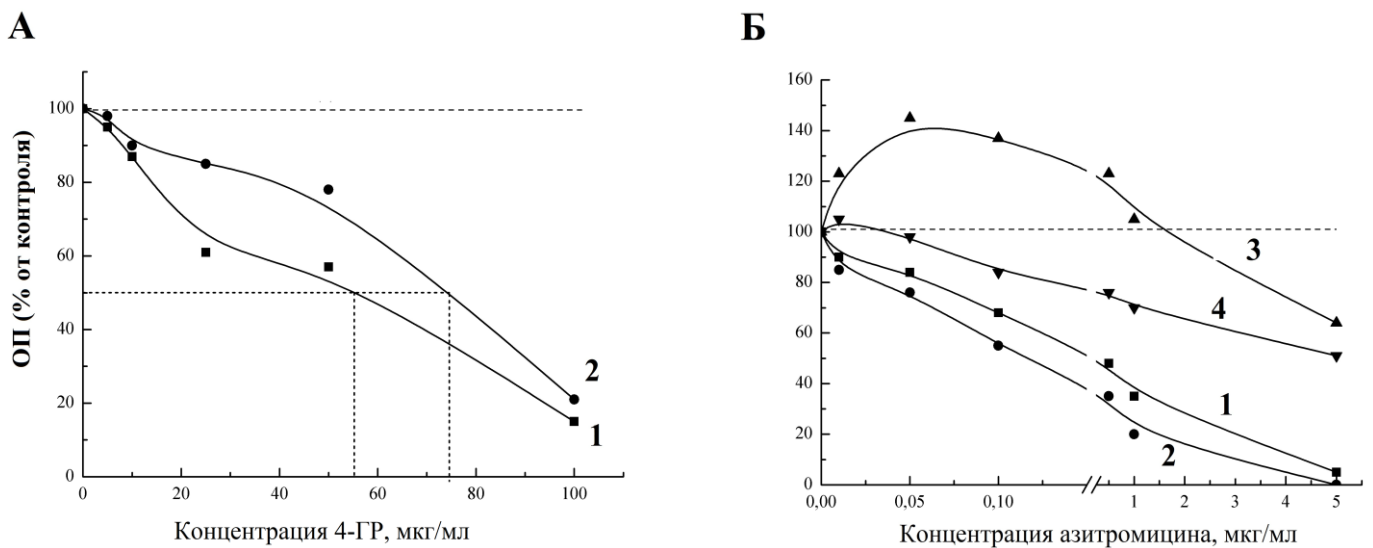
Все эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку данных производили методами как параметрической (для протеомного анализа, t-test), так и непараметрической статистики (тест Манна-Уитни). Значимыми считали различия при значении  $p < 0.05$ . Графики строили при помощи пакета OriginLab 8.6 по алгоритму выбора типичного эксперимента с использованием функции B-spline, а также при помощи программ GraphPad Prism v7.0 и R-Studio с указанием средних значений и стандартных отклонений. Обработку результатов проводили в программном пакете Microsoft Office Excel 2007.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Действие 4-ГР на биопленки модельных микроорганизмов. Устранение эффекта стимуляции роста биопленок азитромицином

*Dietzia natronolimnaea* 26-10 является удобной моделью для выполнения данной задачи, поскольку род *Dietzia* включает в себя как сапротрофных, так и условно-патогенных представителей. Азитромицин в субингибиторных для планктонной культуры концентрациях стимулирует рост биопленок этой бактерии, как показывает окрашивание специфическим красителем диметилметиленовым синим (DMMB) (рис. 1).

Определение влияния 4-ГР на рост *D. natronolimnaea* 26-10 показало, что в отличие от азитромицина активность этого ингибитора в отношении планктонной культуры и биопленки различается не очень сильно: для планктонной культуры ИД<sub>50</sub> составляет 55 мкг/мл, а для биопленки – 75 мкг/мл (рис. 1А). Однако всего лишь при 10 мкг/мл 4-ГР (концентрации, подавляющей рост планктонной культуры и биопленки лишь на 10-12%) не только усиливается ингибиторное действие азитромицина, но и полностью снимается стимулирующий эффект.



**Рисунок 1** — Действие 4- ГР и азитромицина на рост планктонных культур и биопленок *D. natronolimnaea* 26-10: а – действие 4-ГР, планктонная культура (1), биопленка (2); б – действие азитромицина (1, 3) и смеси азитромицина и 4-ГР (10 мкг/мл) (2, 4) на рост планктонной культуры (1, 2) и биопленки (3, 4), биопленка окрашена DMMB.

*Kocuria rhizophila* DC2201. Для данного микроорганизма показана заметная стимуляция роста биопленок, особенно полисахаридных компонентов ВПМ (как показывает окрашивание DMMB) при субингибиторных концентрациях азитромицина. Так же, как и в случае с *D. natronolimnaea* 26-10, не обнаружено значительной разницы в чувствительности к 4-ГР планктонной культуры и биопленки: ИД<sub>50</sub> для планктонной культуры и биопленки, соответственно, равны 7.5 и 16 мкг/мл (при окрашивании DMMB) и 24 мкг/мл (при окрашивании КФ). Однако уже при 5 мкг/мл 4-ГР в отношении планктонной культуры проявляется аддитивный эффект с

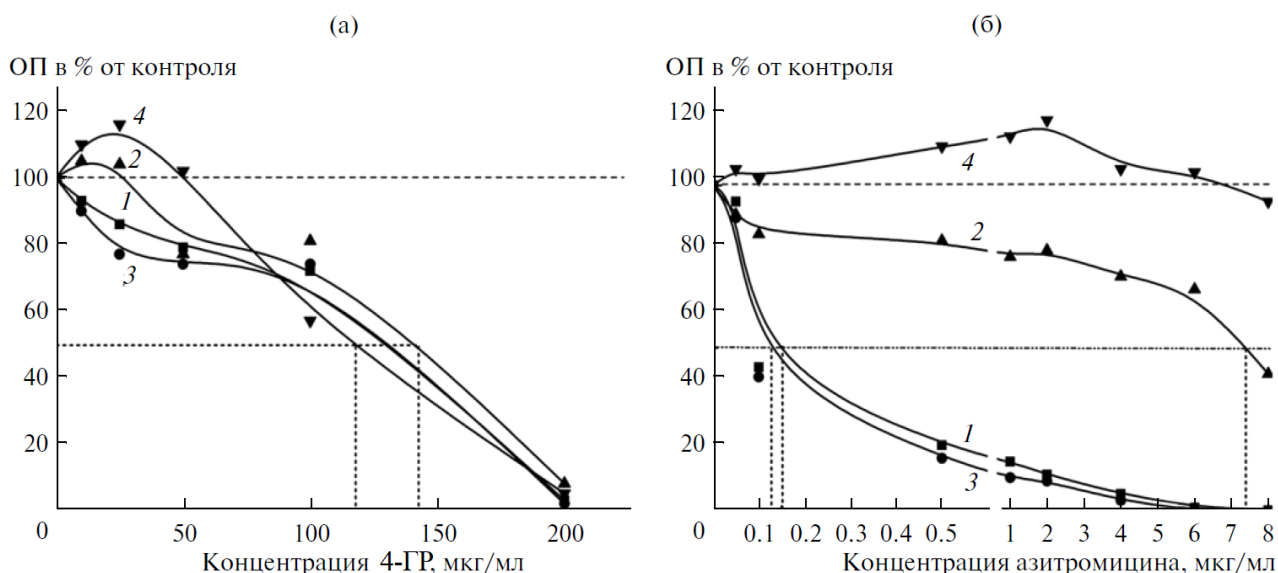
антибиотиком и полностью снимается эффект стимуляции роста биопленок его субингибиторными концентрациями.

***Rhodococcus equi***. Результаты, полученные для данной грамположительной культуры, несколько отличны от предыдущих. При концентрации азитромицина выше 15 мкг/мл рост планктонной культуры подавлен полностью, а рост биопленки продолжается, по крайней мере, до 50 мкг/мл. Однако ИД<sub>50</sub> для планктонной культуры и биопленки имеют сходные значения: 6 мкг/мл и 8 мкг/мл соответственно. Стимуляции биопленок азитромицином для данной культуры не показано, однако синергидный эффект с 4-ГР все равно имеет место как в отношении планктонных культур, так и биопленок. В отношении последних ИД<sub>50</sub> снижается в 2 раза (с 8 до 4 мкг/мл), планктонной культуры – в 30 раз (с 6 мкг/мл до 0.2 мкг/мл).

***P. chlororaphis* 66**. Чувствительность к 4-ГР для данного микроорганизма невелика. (ИД<sub>50</sub> для планктонной культуры 120 мкг/мл, для биопленки – около 200 мкг/мл. Однако при совместном действии азитромицина и 4-ГР чувствительность планктонной культуры к антибиотику несколько возрастает: ИД<sub>50</sub> снижается с 5 до 3 мкг/мл, а главное – полностью снимается эффект стимуляции синтеза биопленки при субингибиторных концентрациях азитромицина (0.05 - 5 мкг/мл).

***C. violaceum***. В данной работе использовали штамм WT и его мутант CV026, неспособный к синтезу АГЛ. Стимуляция азитромицином роста биопленок мутанта CV026 выражена гораздо слабее и сдвинута в сторону меньших концентраций антибиотика по сравнению со штаммом WT (рис. 2б). Эффект стимуляции выражается в преимущественном синтезе внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) (по окрашиванию DMMB), поэтому у штамма с дефектом его синтеза данный эффект оказался ожидаемо менее выражен. Чувствительность планктонных культур и биопленок этих штаммов к 4-ГР невысока и сходна по величине (ИД<sub>50</sub> варьирует в пределах 120 – 140 мкг/мл). При этом 4-ГР в низких концентрациях (до 50 мкг/мл) вызывает даже некоторую степень стимуляции роста биопленки мутанта CV026 (рис. 2а).

При совместном действии азитромицина и 4-ГР (25 мкг/мл) чувствительность роста планктонных культур обоих штаммов и биопленок штамма дикого типа существенно не изменяется. Однако, как и в предыдущих случаях, эффект стимуляции роста биопленок у штамма дикого типа полностью снимается, что может свидетельствовать о регуляторном вмешательстве 4-ГР в этот процесс. В то время как у мутанта в присутствии 4-ГР азитромицин вызывает заметную стимуляцию роста биопленок. Предполагалось, что 4-ГР в данном случае может имитировать действие молекул АГЛ.



**Рисунок 2** — Действие 4-ГР и азитромицина на рост планктонных культур и биопленок *C. violaceum*: а – действие 4-ГР, штамм дикого типа WT(1, 2), мутант CV026 (3, 4), планктонные культуры (1, 3), биопленки (2, 4); б – совместное действие азитромицина и 4-ГР (25 мкг/мл). штамм дикого типа WT (1, 2), мутант CV026 (3, 4), планктонные культуры (1, 2), биопленки (3, 4), биопленка окрашена DMMB.

Для проверки этого предположения планктонную культуру мутанта CV026 инкубировали при меньшем на порядок диапазоне концентраций 4-ГР с добавлением 0.1 мкг/мл N-гексаноил-гомосеринлактона (С6-ГЛ). Измеряли как изменение роста планктонной культуры, так и количество виолацеина колориметрически. Показано, что в данном диапазоне концентраций 4-ГР незначительно подавляет рост планктонной культуры, и гораздо сильнее подавляет синтез виолацеина при 10 мкг/мл 4-ГР. Синергидного эффекта 4-ГР и С6-ГЛ обнаружить не удалось. Можно предположить, что 4-ГР в данном случае воздействует на другие метаболические пути, связанные с формированием биопленок.

### Никлозамид как антибиопленочный агент

*C. violaceum*. Антикворумную активность никлозамида оценивали методом лунок. Тестовые концентрации составляли 50 и 500 мкг/мл. Для сравнения использовали 4-ГР в концентрациях 50 и 100 мкг/мл, не обладающий противокворумной активностью, как было показано ранее. Контролем служили лунки с ДМСО в той же концентрации, что и в тестируемых растворах соединений. Зона ингибирования синтеза виолацеина как меры антикворумной активности составляла около 1 см при самой высокой концентрации. Однако в данной зоне отмечалось значительное подавление роста, что говорит также о возможном бактериостатическом или бактерицидном эффекте никлозамида.

Воздействие никлозамида на рост биопленок хромобактерий в сравнении с планктонной культурой оценивали при помощи метода тefлоновых кубиков. Сравнивали штамм дикого типа WT и мутант CV026, неспособный к синтезу АГЛ. Отмечен значительный стимулирующий эффект низких концентраций никлозамида на

рост биопленок обоих штаммов. Для мутантного штамма эта стимуляция носит, с одной стороны, менее выраженный, с другой – более продолжительный характер.

***P. aeruginosa* PAO1.** Для данного микроорганизма стимуляция роста биопленок низкими концентрациями никлозамида гораздо менее выражена. Рост планктонных культур обоих штаммов ингибируется никлозамидом незначительно, хотя штамм дикого типа несколько более чувствителен. Эффекта стимуляции не наблюдалось, хотя биопленки сохраняют устойчивость даже при максимальной концентрации никлозамида (10 мкг/мл - предел растворимости в данной среде). Так же, как и в случае хромобактерий, для биопленки PAO1 показано существенное ингибирование при окрашивании ДММВ (ИД<sub>50</sub> 5 мкг/мл) по сравнению с КФ, что свидетельствует о преимущественном подавлении синтеза ВПМ. Так же, как для хромобактерий, при выращивании бактерий на фильтрах из стекловолокна нечувствительными к никлозамиду оказались оба штамма (данные не показаны). Можно полагать, что никлозамид влияет на один из этапов перехода планктонных бактерий к прикрепленному существованию, отсутствующий при формировании биопленок на фильтрах.

Таким образом, мы можем предполагать ингибирование никлозамидом системы QS у грамотрицательных бактерий. Однако в целом механизм действия никлозамида на рост биопленок этих организмов остается неясным.

**Грамположительные микроорганизмы.** Значения ИД<sub>50</sub> для модельных штаммов определяли в опытах с фильтрами. В целом все исследуемые организмы демонстрировали высокую чувствительность к никлозамиду. Количество метаболически активных клеток в биопленке значительно снижается уже при 0.1 мкг/мл (до 86% у штамма *Micrococcus luteus* C01), и падает практически до нуля при 1 мкг/мл никлозамида. Исключение составила культура *K. rhizophila* DC2201, для которой была показана высокая по сравнению с *D. natronolimnaea* 2610-1 и штаммами комменсалов устойчивость (ИД<sub>50</sub> составила 0.17 мкг/мл), что более чем в 2 раза превышало ИД<sub>50</sub> у *Staphylococcus aureus* MFP03 (0.08 мкг/мл).

Для более полной картины действия никлозамида на рост *K. rhizophila* DC2201 были проведены дополнительные опыты по выращиванию биопленок на тефлоновых кубиках. При окрашивании биопленок КФ величина ИД<sub>50</sub> оказалась равна 1.6 мкг/мл, что на два порядка превысило ИД<sub>50</sub> при окраске МТТ. Это можно объяснить образованием заметного количества ВПМ данной культурой, которое было показано в наших предыдущих опытах. Можно предположить, что в данном случае никлозамид не влияет, а может быть и усиливает синтез ВПМ в биопленке. ИД<sub>50</sub> при окрашивании МТТ на кубиках почти в 2 раза меньше, чем при окрашивании МТТ на фильтрах.

Для проверки возможности использования никлозамида в составе бинарных препаратов был исследован совместный эффект с азитромицином. Для этого были использованы грамотрицательный штамм *P. aeruginosa* PAO1 и грамположительные *S. aureus* 209 P и *K. rhizophila* DC2201. *P. aeruginosa* является чрезвычайно устойчивой к азитромицину культурой. ИД<sub>50</sub> для планктонной культуры составило около 15

мкг/мл, в то время как рост биопленки в избранном диапазоне концентраций (от 1 до 100 мкг/мл) не ингибируется вовсе, а стимулируется более чем в 40 раз. Добавление никлозамида в концентрации 10 мкг/мл практически не меняет чувствительность планктонной культуры, однако заметно снимает стимуляцию роста биопленок азитромицином.

### Влияние традиционных биоцидов из библиотеки Prestwick Chemical Library на рост биопленок *E. coli*

Библиотека Prestwick Chemical Library (PCL) включает в себя 1280 соединений, одобренных FDA. Рост планктонных культур и биопленок оценивали методом окрашивания биопленок кристаллическим фиолетовым, эксперименты проводили в иммунологических планшетах. Все соединения брали в концентрации 10 мкМ. Результаты приведены на рис. 3. По его итогам отобрали 6 перспективных кандидатов с наиболее выраженным эффектом на рост биопленок в сравнении с действием на планктонную культуру. Среди них 1 биоцид широкого спектра действия (клиохинол, (CQ)), 2 антибактериальных соединения (пипемидовая кислота (PA), цефуроксим, (CF)), противовирусный препарат (азидотимидин, (AZT)), и 2 сурфактанта (тилоксапол (TX), бромид тонзония (TZ)). Отобранные соединения были протестированы дополнительно в диапазоне 2-кратных разведений.

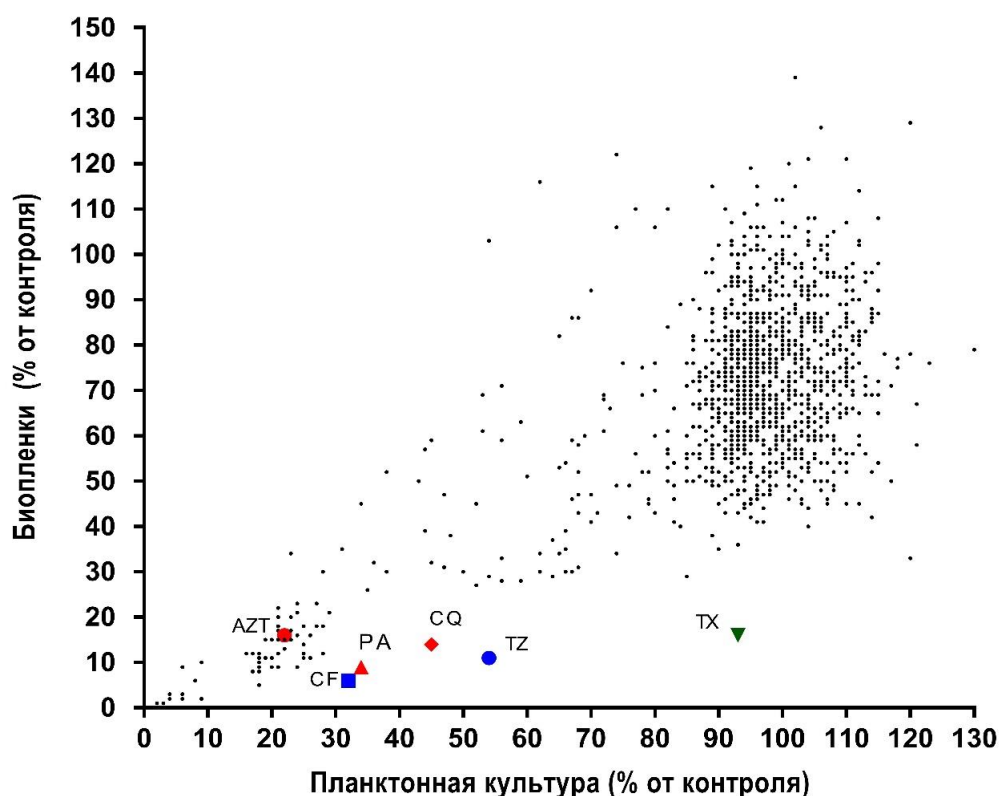
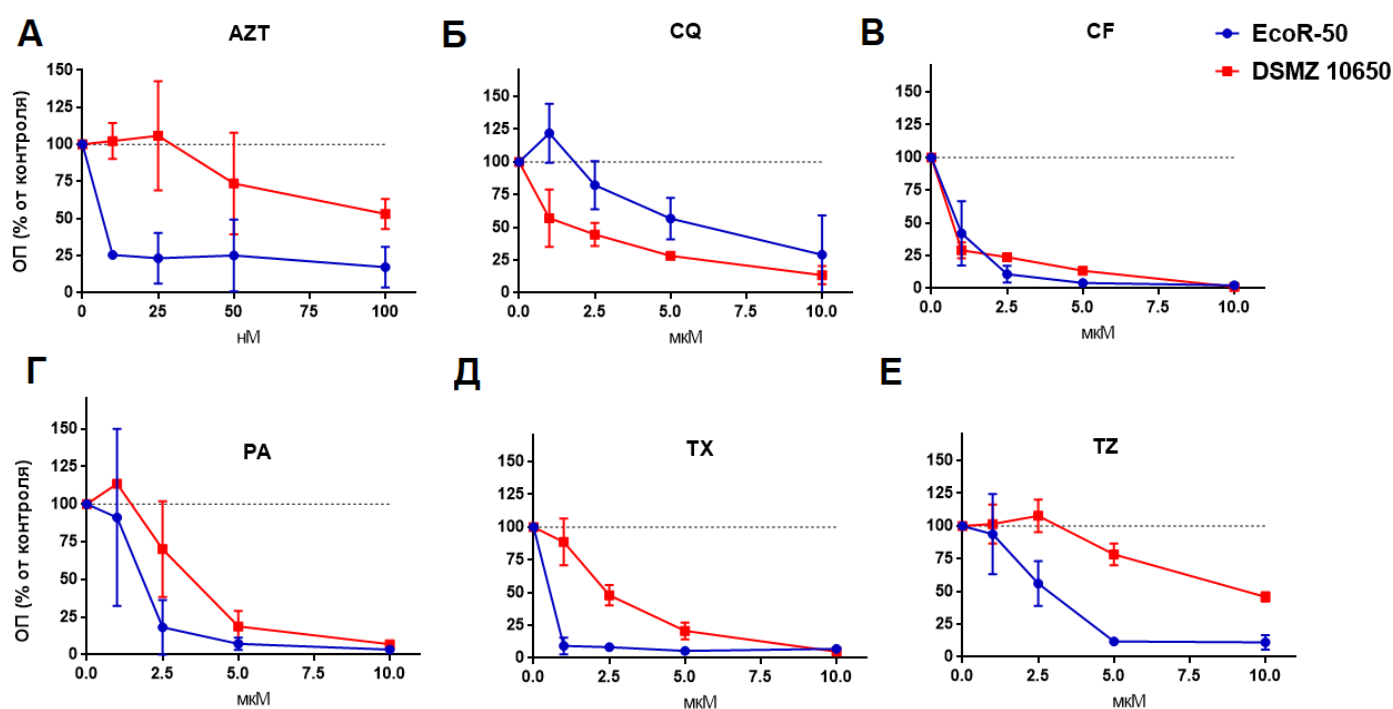


Рисунок 3 — Рост биопленок и планктонных культур при воздействии 10 мкМ соединений из библиотеки PCL для *E. coli* W3110. Выделены соединения-кандидаты.

Для всех соединений показан выраженный антибиопленочный эффект в исследуемом диапазоне (1.25 – 10 мкМ). AZT обладает гораздо более выраженным эффектом, поэтому для этого соединения был взят на порядок меньший диапазон концентраций (12.5 – 100 нМ). Для ТХ, AZT, РА, отмечена небольшая стимуляция роста планктонной культуры в низких концентрациях, при этом ингибиторное действие на биопленки сохраняется. В частности, для клиохинола ИД<sub>50</sub> для биопленок составляет примерно 2.5 мкМ, в то время как для планктонной культуры около 9 мкМ, то есть биопленки в 3.6 раза более чувствительны к данному препарату. При этом антибиопленочный эффект наблюдается в концентрациях выше 1.25 мкМ. Для цефуроксима ИД<sub>50</sub> примерно одинакова для планктонной культуры и биопленок (2.5 мкМ), однако с увеличением концентрации рост биопленок снижается почти в 2 раза быстрее.

Было протестировано влияние бактерицидных препаратов, а также AZT на рост биопленок двух уропатогенных штаммов: *E. coli* DSMZ 10650 и *EcoR50* (рис. 4).



**Рисунок 4.** - Действие азидотимида (А), клиохинола (Б), цефуроксима (В), пипемидовой кислоты (Г), тилоксапола (Д), бромид тонзония (Е) на рост биопленок уропатогенных штаммов *E. coli* DSMZ 10650 и *EcoR50*. Биопленки выращивали на иммунологических планшетах.

Биопленки *EcoR-50* оказались наиболее чувствительным ко всем исследуемым соединениям, кроме клиохинола, для которого показана более выраженная активность в отношении штамма DSMZ 10650 (ИД<sub>50</sub> порядка 1.5 мкМ). Наибольшая эффективность показана для антибиотика цефуроксима и сурфактанта тилоксапола, наименьшая – для бромид тонзония. Для последнего ИД<sub>50</sub> в отношении более чувствительного штамма *EcoR50* составляет 2.5 мкМ, а для DSMZ 10650 – 10 мкМ.



Наше предположение состояло в том, что исследуемые соединения воздействуют на процесс перехода от биопленочного фенотипа к планктонному. Для проверки гипотезы были сконструированы репортерные штаммы для промоторов генов *fliC* (кодирует структурный белок жгутика), и *csgA* (кодирует структурный белок фибриллы курли, главного компонента ВПМ для данного штамма). Использовали готовые плазмиды на основе вектора pTrc99A из коллекции отдела системной и синтетической микробиологии института Макса Планка (Department of Systems and Synthetic Microbiology, MPI, Германия), трансформацию проводили методом теплового шока. Уровень экспрессии оценивали методом проточной цитометрии по усредненным значениям интенсивности флуоресценции (в условных единицах).

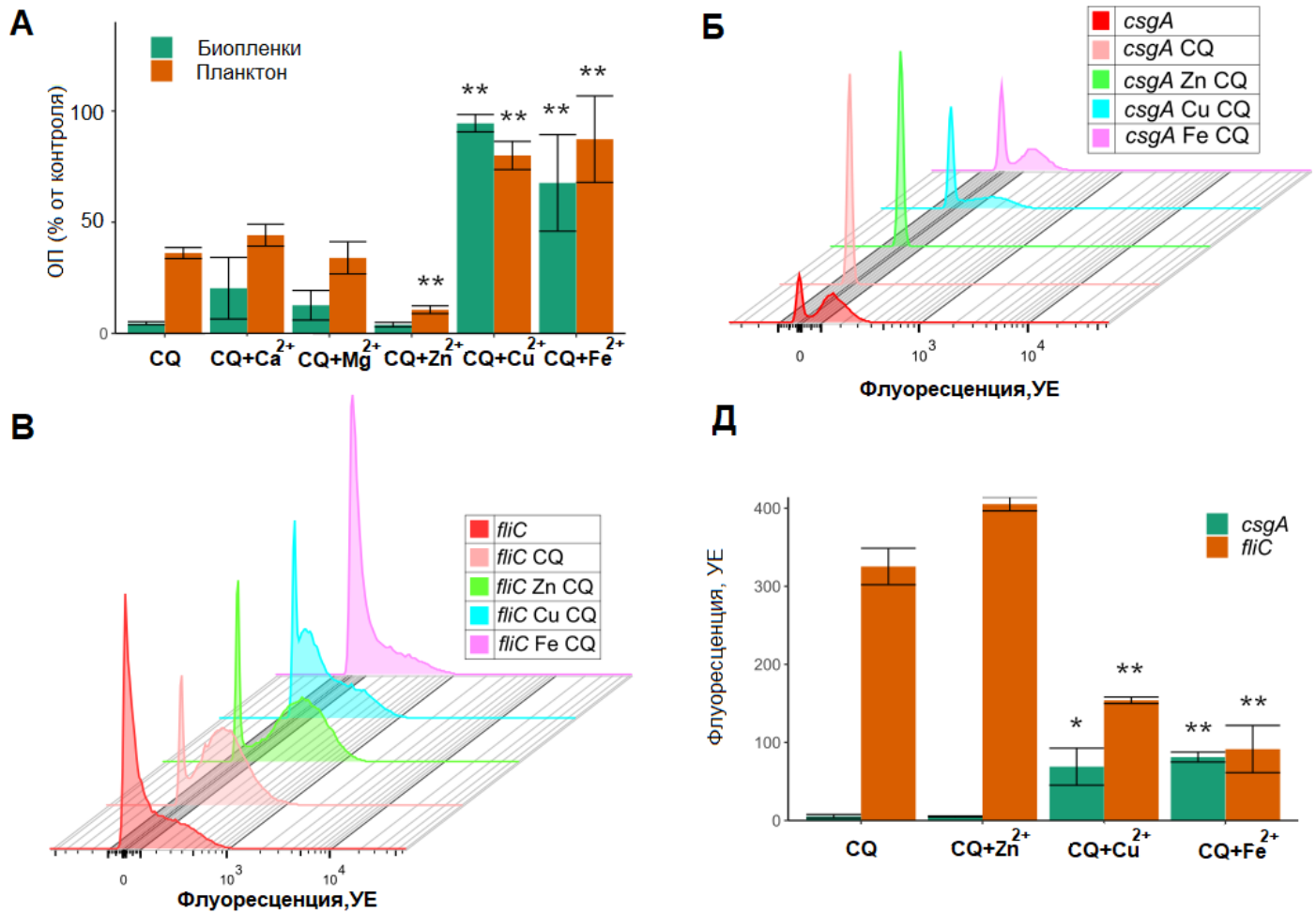
Из всех исследуемых соединений только ТХ не оказывал выраженного действия на активность промоторов *fliC* и *csgA*, что говорит о том, что данное соединение обладает исключительно антиадгезивным действием, и не оказывает никакого влияния на рост самих биопленок и синтез ВПМ. Остальные соединения заметно снижают как процент флуоресцирующих клеток, так и интенсивность флуоресценции для репортера *PcsgA-egfp*, и, наоборот, увеличивают эти показатели для репортера *PfliC-egfp*. Примечательно, что для TZ значимое снижение процента флуоресцирующих клеток репортера *PcsgA-egfp* не показано, однако интенсивность флуоресценции снижается практически в 5 раз. Данный эффект также может объясняться воздействием на начальные этапы формирования биопленки.

С целью более детального изучения механизма действия AZT, клиохинола, цефуроксима и пипемидовой кислоты был проведен протеомный анализ. AZT брали в концентрации 0.1 мкМ, РА - 10 мкМ, CF – 2.5 мкМ, CQ – 1 мкМ. Как и ожидалось, количество структурных белков курли (CsgA, CsgB, CsgC) снижалось во всех случаях, за исключением клиохинола. Однако набор изменяющих свое содержание белков во многом уникален для каждого соединения. Тот факт, что уровень транскрипционного регулятора CsgD меняется в биопленочных клетках только при воздействии AZT и РА, говорит об альтернативных механизмах ингибирования биосинтеза курли. Для AZT и РА показан общий тип стрессового ответа: оба соединения индуцируют SOS-репарацию ДНК, что заметно по многократному увеличению количества белка YebG. Это согласуется с литературными данными, согласно которым пипемидовая кислота ингибирует бактериальную топоизомеразу II (гиразу). Азидотимидин известен в первую очередь как ингибитор обратной транскриптазы ретровирусов, в данном случае это соединение вмешивается в процессы репарации и репликации ДНК. Также для обоих соединений показано увеличение эффлюксного насоса множественной лекарственной устойчивости MdtE, ответственного за транспорт ксенобиотиков (Nishino et al., 2001). Показано также снижение количества фактора транскрипции McbR (Zhang et al., 2008) участвующего в образовании биопленок, при воздействии РА, и в меньшей степени, AZT. В целом, по имеющимся данным можно предположить, что антибиопленочный эффект этих двух соединений есть следствие



эффекта бактериостатического; последний может быть вызван подавлением репликации ДНК.

Несколько противоречивые результаты показаны для цефуроксима. CF относится к цефалоспориновым антибиотикам, ингибирующим синтез клеточной стенки. Однако при этом показано увеличение количества адгезинов, в частности, белка FimH – регулятора сборки и адгезии фимбрий типа I. Очевидно, данный препарат, не препятствуя адгезии клеток к поверхности, подавляет при этом дальнейший рост клеток, препятствуя, таким образом, созреванию биопленки.



**Рисунок 5** — А. Влияние бивалентных катионов на рост планктонной культуры и биопленок *E. coli* W3110 при 10 мкМ CQ. Б, В - Зависимость активности промоторов *csgA* (Б) и *fliC* (В) (в условных единицах флуоресценции GFP) для репортерных штаммов *E. coli* W3110 при воздействии 10 мкМ клиохинола (CQ), в сочетании с 10 мкМ Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, определенная при помощи проточной цитометрии, Г – интенсивность флуоресценции для обоих репортертов при воздействии 10 мкМ клиохинола, по отдельности и в сочетании с 10 мкМ Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, \*P<0.05, \*\*P<0.01, тест Манна-Уитни.

Принципиально иной эффект на рост биопленок оказывает клиохинол. Повышенное содержание белков, ответственных за транспорт железа (FeoC, EntB), а также катионов цинка и кадмия (ZntA) свидетельствует о хелатирующем эффекте клиохинола. Можно предполагать, что CQ индуцирует неспецифический  $\sigma$ S-

зависимый ответ на стресс голодания, который усиливает транскрипцию жгутиковых генов и подавляет экспрессию генов курли, подавляя таким образом созревание микробных биопленок. Для проверки этого предположения оценивали рост биопленок на иммунологических планшетах, а также флуоресценцию GFP для репортеров *PcsgA-egfp* и *PfliC-egfp* при сочетании 10 мкМ клиохинола с добавлением дополнительно к среде 10 мкМ бивалентных катионов ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ). Результаты представлены на рис. 5. Рост планктонных культур и биопленок не меняется при добавлении катионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , однако значительно возрастает при добавлении  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , что свидетельствует о снятии ингибиторного эффекта. Для катионов цинка, напротив, показан совместный ингибиторный эффект с CQ.

### **Антибиопленочный эффект сульфатазиола в сочетании с азитромицином**

Биопленка *K. rhizophila* DC2201 высоко устойчива к ингибиторному действию СТЗ. Однако, для данного микроорганизма удалось обнаружить слабый аддитивный ингибиторный эффект азитромицина и СТЗ в отношении планктонной культуры и биопленок. Кроме того, СТЗ способен снимать эффект нежелательной стимуляции роста биопленки, вызванной сверхнизкими концентрациями азитромицина.

Биопленки *P. chlororaphis* 449 оказались чувствительными к действию СТЗ в более высоком диапазоне концентраций по сравнению с планктонной культурой. Стимуляция роста биопленок низкими концентрациями азитромицина уменьшается для данного микроорганизма при сочетании с 300 мкг/мл СТЗ.

### **Действие пробиопленочных агентов**

**Стимуляция синтеза феназинов никлозамидом в биопленках *P. aeruginosa* PAO1.** Феназины – гетероциклические соединения, обладающие широким спектром антибиотической активности и являющиеся факторами вирулентности. К примеру, пиоцианин, выделяемый *P. aeruginosa*, вызывает окислительный стресс в тканях хозяина, повреждая его клетки и выполняя тем самым важную роль в патогенезе (Hall et al., 2016). Кроме того, пиоцианин вызывает апоптоз нейтрофилов (Prince et al., 2008). Для некоторых феназинов также показана противоопухолевая активность (Guttenberger et al., 2017).

При помощи тонкослойной хроматографии было изучено изменение состава феназинов для планктонных культур дикого штамма *P. aeruginosa* PAO1 и мутантного штамма *P. aeruginosa* PAO1 6863. Штамм *P. aeruginosa* PAO1 6863, неспособный к синтезу АГЛ, отличается составом пигментов от штамма дикого типа, как можно судить о различной окраске супернатантов (сине-зеленый у мутанта, желтый у штамма дикого типа) при равной оптической плотности, и в целом продуктивность синтеза феназинов меньше. Показана стимуляция никлозамидом желтого флуоресцирующего пигмента феназин-1-карбоновой кислоты (РСА), которая является предшественником пиоцианина в биосинтезе (Blankenfeldt, Parsons, 2014). Из этого можно сделать вывод, что синтез пиоцианина стимулируется не напрямую, а через

синтез РСА. Синтез пиоцианина стимулируется никлозамидом для обоих штаммов. В то же время никлозамид практически не влияет на продукцию феназинов в биопленках штамма дикого типа *P. aeruginosa* PAO1, но сильно стимулирует продуктивность штамма *P. aeruginosa* PAO1 6863, дефектного по системе QS.

Полученные данные говорят о сложном, непрямом механизме интерференции никлозамида с бактериальной системой QS, а также имеют очень важное значение для биотехнологии производства феназинов, находящих практическое применение, в том числе как антигрибные биоциды.

**Влияние ДМСО на биосинтез виолацеина в биопленках *C. violaceum*.** Было показано увеличение синтеза виолацеина в биопленках, выращенных как при наличии равновесия с планктонной культурой (в опытах с тефлоновыми кубиками и планшетами), так и при отсутствии такого равновесия (в опытах с биопленками-колониями на фильтрах из стекловолокна) при воздействии ДМСО в диапазоне концентраций 1.5-5 %. В биопленках мутантного штамма *C. violaceum* CV026 в этих условиях биосинтеза виолацеина не наблюдается. Для выяснения возможной связи стимулирующего воздействия ДМСО на биосинтез виолацеина с системой QS мы использовали биосенсорный мутант *C. violaceum* CV026. Оказалось, что ДМСО усиливает синтез виолацеина в планктонной культуре *C. violaceum* CV026 только при одновременном присутствии низких концентраций С6-АГЛ, не индуцирующих синтез виолацеина.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия «перенацеливания лекарств» («drug repurposing») является наиболее перспективной для поиска новых антибиопленочных агентов, поскольку предполагает новое применение уже используемых в клинической практике соединений. Кроме того, перспективным представляется также поиск принципиально новых пробиопленочных агентов. В настоящей работе были использованы оба этих подхода.

Перспективным соединением оказался представитель класса алкилоксибензолов (АОБ) – 4-гексилрезорцин, который широко применяется в качестве пищевого консерванта главным образом в мясе ракообразных. Вместе с тем, возможно его применение и в больших концентрациях, вплоть до 50-60 мг/кг массы тела (Aguillar et al., 2014; Nikolaev et al., 2020). Бактерицидный эффект 4-ГР может быть основан на связывании со множеством мишеней. В данной части работы подробно изучена активность 4-ГР в качестве возможного антибиопленочного агента, как самого по себе, так и в сочетании с азитромицином. Согласно полученным результатам, 4-ГР в диапазоне концентраций, нетоксичных для человека, обладает выраженным антимикробным действием, а главное – значительно увеличивает чувствительность тестируемых грамположительных бактерий к азитромицину, снимая нежелательный эффект стимуляции роста биопленок суббактериостатическими концентрациями антибиотика. Как показывает окрашивание специфическим для кислых полисахаридов красителем ДММВ для 4-ГР главной мишенью являются пути

биосинтеза углеводов компонентов матрикса. Для проверки возможной интерференции 4-ГР и системы quorum sensing было изучено влияние на синтез виолацеина штаммом CV026 в планктонной культуре в присутствии сигнальной молекулы-индуктора С6-ГЛ. Однако совместного эффекта обнаружить не удалось. Для объяснения данного механизма требуются дальнейшие исследования.

По аналогии с 4-ГР, как широко применяемым продуктом, было изучено действие салициланилидного препарата никлозамида (2',5-дихлоро-4'-нитросалициланилида) как перспективного модулятора роста биопленок. Первой задачей была проверка влияния никлозамида на бактериальную систему quorum sensing модельных штаммов *C. violaceum* и *P. aeruginosa*. Исследования антикворумной активности с использованием мутантных штаммов показали отсутствие специфического подавления системы QS. Вместе с тем была показана стимуляция никлозамидом продукции антибиотиков-феназинов, в частности пиоцианина, в значительной большей степени у мутантного штамма с нарушенной системой QS. Методом тонкослойной хроматографии обнаружен различный состав пигментов у штамма дикого типа и мутанта, а также стимуляция у мутанта синтеза предшественника пиоцианина – РСА. Полученные данные, с одной стороны, говорят об опосредованном влиянии никлозамида на бактериальную систему QS, а с другой - о потенциальной возможности применения никлозамида в качестве пробиопленочного агента для биотехнологического синтеза феназинов.

В роли подобных «непрямых индукторов» синтеза биологически активных веществ в биопленках могут выступать не только неспецифические биоциды, но и органические растворители. В настоящей работе показан стимулирующий эффект ДМСО на синтез виолацеина (находящего применение в качестве биоцида и противопухолевого агента) в клетках *C. violaceum* WT. Также была показана способность ДМСО проявлять синергидное индуцирующее действие сигнальных молекул С6-ГЛ на синтез виолацеина. Однако в настоящее время нельзя исключить и альтернативные механизмы влияния ДМСО на биосинтез виолацеина, не связанные с функционированием системы QS. Несомненно, что расшифровка молекулярного механизма стимулирующего действия ДМСО на биосинтез виолацеина позволила бы целенаправленно воздействовать на данный процесс, в том числе и методами генетической инженерии (Мартьянов с соавт., 2018).

Никлозамид в диапазоне концентраций, не токсичных для человека, обладает выраженным (сравнимым с антибиотиками) бактериостатическим эффектом в отношении модельных грамположительных бактерий, а также может быть рекомендован в качестве бинарного препарата в сочетании с антибиотиком азитромицином для снятия нежелательной стимуляции роста биопленок, вызываемой субингибиторными концентрациями последнего. Сходным эффектом обладает сульфатазол из группы сульфаниламидных соединений. Результаты, полученные для *K. rhizophila* DC2201 и *P. chlororaphis* 449, свидетельствуют об аддитивном антибиопленочном эффекте сульфатазола в сочетании с антибиотиком

азитромицином. В отношении биопленок *P. chlororaphis* 449 сульфатаiazол проявлял более сильный ингибиторный эффект по сравнению с планктонной культурой, что может косвенно подтверждать ранее полученные данные (Antoniani et al., 2010) об ингибировании им ц-ди-ГМФ-зависимых систем

Продолжением этих работ был скрининг соединений библиотеки Prestwick Chemical Library, на предмет антибиопленочной активности в отношении модельного штамма *E. coli* W3110. По итогу скрининга были отобраны 6 соединений, среди них 1 биоцид широкого спектра действия (клиохинол), 2 антибактериальных соединения (пипемидовая кислота, цефуроксим), противовирусный препарат (азидотимидин), и 2 сурфактанта (тилоксапол, бромид тонзония). Данные, полученные методом проточной цитометрии для репортерных штаммов показали, что все указанные соединения, за исключением тилоксапола, индуцируют переход от биопленочного фенотипа к планктонному.

Результаты протеомного анализа для клиохинола (CQ), азидотимидина (AZT), пипемидовой кислоты (PA) и цефуроксима (CF) показали сходный тип стрессового ответа для AZT и PA, и принципиально различный эффект для остальных двух соединений. AZT и PA индуцируют SOS-репарацию ДНК, что заметно по многократному увеличению количества белка YebG. Это согласуется с литературными данными, согласно которым пипемидовая кислота ингибирует бактериальную топоизомеразу II (гиразу). AZT известен в первую очередь как ингибитор обратной транскриптазы ретровирусов, в данном случае это соединение вмешивается в процессы репарации и репликации ДНК. Также для обоих соединений показано увеличение эффлюксного насоса множественной лекарственной устойчивости MdtE, ответственного за транспорт ксенобиотиков (Nishino et al., 2001). Показано также снижение количества фактора транскрипции McbR (Zhang et al., 2008) участвующего в образовании биопленок при воздействии PA, и в меньшей степени, AZT. В целом, по имеющимся данным можно предположить, что антибиопленочный эффект этих двух соединений вторичен и опосредован подавлением репликации ДНК. Механизм антибиопленочного действия CF связан с поздними стадиями формирования биопленок: не препятствуя адгезии клеток к поверхности, он подавляет дальнейший рост клеток, препятствуя таким образом созреванию биопленки.

Результаты протеомики для CQ указывали на неспецифический  $\sigma^S$ -зависимый стресс голодания, который связан с хелатирующим эффектом данного препарата. Снятие ингибиторного эффекта CQ при добавлении бивалентных катионов железа и меди свидетельствует о том, что именно хелатирующее действие клиохинола лежит в основе его антибиопленочного эффекта. Кроме того, полученные данные подтверждают важную, если не ключевую роль бивалентных катионов как регуляторов роста биопленок у данного микроорганизма. В образовании биопленок и транспорте бивалентных катионов *E. coli* участвует фактор транскрипции Fur. Он подавляет экспрессию более 90 генов в клетке после активации ионами железа или цинка (Hancock, et al., 2010). Fur не только регулирует транспорт железа, но и

контролирует другие процессы в клетке, такие как, сукцинатный, фумаратный, и ацетатный метаболизм; хемотаксис, экспрессия жгутика, а также окислительные и кислотные стрессы, и играет роль в патогенезе. Возможно в данном случае имеет место Fur-зависимая регуляция, однако не исключены и другие механизмы. В частности, железо может косвенно стимулировать рост биопленок *E. coli* путем индукции окислительного стресса (DePas et al., 2013). Двухвалентная медь индуцирует экспрессию генов двухкомпонентной системы SrxAR, играющую важную роль в «чувстве поверхности» и начальных этапах роста биопленки (Kimkes, Heinemann, 2018). Согласно полученным результатам, ингибиторный эффект на биопленки CQ не снимается цинком, что соответствует ранее полученными данными, согласно которым стимуляция роста биопленок при добавлении Fe (II) пропадает при наличии Zn (II). Авторам (Hancock et al., 2010) удалось показать, что подобный эффект объясняется гораздо большим сродством транскрипционного фактора Fur к цинку. Повышенное содержание в клетке активированного комплекса Fur-Zn приводит к репрессии систем транспорта Fe (II). Рост планктонных культур не ингибируется катионами  $Zn^{2+}$ , однако в сочетании с клиохинолом можно наблюдать выраженный синергидный ингибиторный эффект. По-видимому, CQ связывает свободные катионы железа, в то время как цинк ингибирует системы трансмембранного транспорта Fe(II).

Для оценки возможности применения данных соединений в клинической практике также использовали два клинических уропатогенных изолята *E. coli* DSMZ 10650 и EcolR50. Наиболее эффективным против клинических изолятов оказался антибиотик CF. Это объясняется показанным в работе ранее сильным бактериостатическим эффектом. Биопленки клинических изолятов обладают гораздо менее выраженной трехмерной структурой, но вместе с тем гораздо сильнее адгезируются к поверхности. Этим объясняется высокая эффективность антиадгезивного препарата тилоксапола, и несколько меньшая эффективность для остальных соединений, оказывающих воздействие на рост биопленки и синтез матрикса. Тем не менее, все 6 отобранных соединений из библиотеки PCL являются перспективными для дальнейших исследований по применению в клинической практике в качестве антибиопленочных агентов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были сформулированы основные принципы поиска антибиопленочных препаратов, опубликованные в дискуссионной статье (Плакунов с соавт., 2019). В частности, мы обратили внимание на необходимость проверки у исследуемых соединений не только анти-, но и пробиопленочной активности. Сформулированный подход позволил обнаружить пробиопленочную активность у ряда соединений, в частности, у антибиотика азитромицина. Стимулирующий эффект антибиотика азитромицина, осложняющий его применение в химиотерапии инфекций нам удалось устранить при помощи традиционных биоцидов: 4-ГР, никлозамида и сульфатиазола.

Не менее важным подходом оказался поиск антибиопленочных агентов среди соединений, широко применяемых в клинической практике. Таким методом были обнаружены антибиопленочные свойства одобренных FDA 6 соединений из коммерческой библиотеки в отношении как модельного, так и уропатогенных штаммов *E. coli*. При помощи протеомики были показаны разные типы стрессовых ответов, лежащие в основе механизма действия обнаруженных соединений.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые показана возможность устранения стимулирующего эффекта суббактериостатических концентраций антибиотика азитромицина на рост биопленок хемоорганотрофных грамположительных и грамотрицательных бактерий из разных экотопов путем воздействия традиционных лекарственных препаратов: сульфатаизола и никлозамида, а также пищевого консерванта 4-гексилрезорцина.
2. Установлено, что 4-гексилрезорцин преимущественно подавляет биосинтез компонентов внеклеточного полимерного матрикса, а никлозамид является ингибитором системы quorum sensing, хотя и не специфическим, поскольку высокоактивен также против планктонных культур грамположительных бактерий. Установлено, что никлозамид при высоких концентрациях (до 10 мкг/мл) способен стимулировать биосинтез антибиотиков-феназинов у *P. aeruginosa*. Данный эффект связан с опосредованным воздействием никлозамида на систему quorum sensing. Это его свойство может быть использовано для повышения эффективности биотехнологического производства феназинов в биопленках продуцентов
3. Впервые обнаружен выраженный антибиопленочный эффект 6 одобренных FDA соединений, отобранных из библиотеки Prestwik Chemical Library, активных в отношении биопленок как модельного, так и патогенных штаммов *E. coli*. Показано, что в основе антибиопленочного эффекта тилоксапола лежит подавление адгезии, в то время как остальные соединения (клиохинол, пипемидовая кислота, азидотимидин, цефуроксим и бромид тонзония) подавляют как рост, так и созревание биопленок.
4. Установлено, что в основе антибиопленочного эффекта клиохинола, пипемидовой кислоты, азидотимидина и цефуроксима лежит подавление формирования амилоидных белков курли на уровне транскрипции. При помощи протеомики для противовирусного препарата азидотимидина, а также для антибактериальных соединений – пипемидовой кислоты, цефуроксима и клиохинола - показано, что в основе антибиопленочного эффекта лежат разные типы стрессовых ответов. Для клиохинола данный эффект связан с его хелатирующими свойствами, в частности, связыванием ионов Fe(II).

5. Обнаружено, что диметилсульфоксид в диапазоне концентраций от 1.5 до 5% стимулирует синтез виолацеина в биопленках хромобактерий. Механизм данного явления косвенно связан с воздействием на бактериальную систему quorum sensing.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

#### *Экспериментальные статьи*

1. **Мартьянов С.В.**, Журина М.В., Эль-Регистан Г.И., Плакунов В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование микробных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология. – 2015. – Т. 84 (1). – С. 27-36.
2. Плакунов В.К., **Мартьянов С.В.**, Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в стационарных условиях // Микробиология. – 2016. – Т. 85 (4). – С. 484-489.
3. Журина М.В., Ганнесен А.В., **Мартьянов С.В.**, Тетенева Н.А. Никлозамид как перспективный антибиопленочный агент // Микробиология. – 2017. Т.86 (4). – С. 439–447.
4. **Мартьянов С.В.**, Летаров А.В., Иванов П.А., Плакунов В.К. Стимуляция биосинтеза виолацеина в биопленках *Chromobacterium violaceum* под воздействием диметилсульфоксида // Микробиология. – 2018. Т.87 (3). – С. 325–329.
5. Teteneva N.A., **Mart'yanov S.V.**, López M-E., Kahnt J., Glatter T., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Sourjik V. Multiple drug-induced stress responses inhibit formation of *Escherichia coli* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2020. – V. 86 (21). – P. 1113-20.

#### *Обзорные статьи*

1. Плакунов В.К., **Мартьянов С.В.**, Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты // Микробиология. – 2017. – Т.86 (4). – С. 1-19.
2. Плакунов В.К., Журина М.В., Ганнесен А.В., **Мартьянов С.В.**, Николаев Ю.А. Антибиопленочные агенты: неоднозначность терминологии и стратегии поиска // Микробиология. 2019. – Т.88 (6). – С. 705-709.

#### *Тезисы конференций*

1. **Мартьянов С.В.**, Журина М.В. Плакунов В.К. Подавление 4-гексилрезорцином эффекта стимуляции формирования бактериальных биопленок низкими концентрациями антибиотика // Материалы XXVII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». М. 2015. С. 160.



2. **Мартьянов С.В.**, Журина М.В., Плакунов В.К.. Механизм синергидного ингибиторного эффекта 4-гексилрезорцина и азитромицина на формирование микробных биопленок // Сборник тезисов 19-ой Международной школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века». Россия. Пущино. 20-24 апреля 2015 г. С. 185-186.
3. Журина М. В., Ганнесен А. В., **Мартьянов С. В.**, Тетенева Н. А, Плакунов В. К. Новый подход к традиционным биоцидам: использование лекарственных препаратов в качестве антибиопленочных агентов // Сборник тезисов X молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». Россия. Москва. 27-30 октября 2015. С. 112-115.
4. Тетенева Н. А., Журина М. В., Ганнесен А. В., **Мартьянов С. В.**, Плакунов В.К. Новый антибиопленочный агент – никлозамид // Сборник тезисов XI Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». Россия. Москва. 01-02 ноября 2016 г. С.: 140-142.
5. **Mart'yanov S.V.**, Zhurina M.V., Gannesen A.V., Teteneva N.A., Plakunov V.K. The new antibiofilm drug, based on the combination of alkylhydroxybenzene compound and azithromycin // Book of abstracts of the «Antimicrobial resistance in microbial biofilms and options for the treatment» Congress. Oct 5-7, 2016. Belgium, Ghent.
6. Журина М.В., Тетенева Н.А., Ганнесен А.В., **Мартьянов С.В.**, Плакунов В.К. Поиск новых антибиопленочных агентов: никлозамид // Сборник тезисов XXIX Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 7-10 февраля 2017 г. Россия. Москва. С. 121.
7. **Мартьянов С.В.** Управление формированием биопленок у нефтеокисляющих и модельных грамположительных и грамотрицательных бактерий // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН. Россия. Москва. 19-25 июня 2017 г. С. 122-3.
8. Тетенева Н.А., Журина М.В., **Мартьянов С.В.**, Плакунов В.К. Стимулирующий эффект никлозамида на биосинтез феназинов бактерий рода *Pseudomonas* // Материалы I Российского микробиологического Конгресса. 17-18 окт. 2017 г. Россия, Пущино. С. 128-129.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

4-ГР – 4-гексилрезорцин;

СТЗ – сульфатиазол;

ТХ – тилоксапол;

TZ – бромид тонзония;

СQ- клиохинол;

AZT –азидотимидин;

CF – цефуроксим;

РА – пипемидовая кислота;

АГЛ – ацилгомосеринлактон;

АОБ - алкилоксибензолы;

ВПМ – внеклеточный полимерный матрикс;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИД<sub>50</sub> – ингибирующая доза антимикробного препарата, подавляющая рост на 50 %;

ц-ди-ГМФ – циклический гуанозиномонофосфат;

FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов  
США

QS –quorum sensing, «чувство кворума».