

Федеральное государственное учреждение  
**«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»**  
(ФИЦ Биотехнологии РАН)

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание учёной степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:**  
Плакунов В.К.  
д.б.н., профессор

**Москва – 2021**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>5</b>
<b>СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ</b> .....	<b>10</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>12</b>
1.1 Краткая история «биофильмологии» и её текущее состояние. Проблема применения антибиотиков .....	12
1.2 Воздействие на адгезию и начальные этапы формирования микробных биопленок.....	18
1.3 Ингибиторы созревании биопленок .....	20
1.3.1 Ингибиторы бактериального «чувства кворума» (QSI).....	20
1.3.1.1 Краткий обзор бактериальных систем QS.....	20
1.3.1.2 Ингибиторы рецепторов сигнальных молекул QS.....	23
1.3.1.3 Ингибирование синтеза сигнальных молекул.....	25
1.3.1.4 Ингибирование функционирования сигнальных молекул систем QS .....	27
1.3.2 Ингибиторы систем, зависящих от циклического дигуанозинмонофосфата .....	28
1.4 Ингибирование зрелых биопленок.....	30
1.4.1 Использование литических ферментов .....	30
1.4.2 Стимуляция дисперсии биопленки.....	33
1.4.3 Использование полисахаридов и гликолипидов .....	33
1.4.4 Борьба с персистенцией в биопленках .....	34
1.4.5 Использование бактериофагов.....	34
1.5 Стратегии поиска модуляторов роста биопленок.....	35
1.5.1 Модуляторы, вырабатываемые высшими организмами.....	35
1.5.2 Стратегия «перенацеливания лекарств».....	39
1.6 Стимуляторы роста микробных биопленок .....	42
1.6.1 Антибиотики как индукторы роста биопленок.....	42
1.6.2. Другие стимуляторы роста биопленок .....	44

1.6.3 Расширенное понятие о модуляторах роста биопленок .....	45
<b>ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>46</b>
2.1 Объекты исследования.....	46
2.2 Методы хранения и культивирования.....	48
2.3. Используемые модуляторы роста биопленок .....	49
2.3.1 Антибиопленочные агенты .....	49
2.3.2 Пробиопленочные агенты.....	50
2.4 Методы получения и количественной оценки биопленок.....	50
2.4.1. Получение биопленок на тефлоновых кубиках .....	50
2.4.2 Получение и оценка метаболической активности клеток биопленок на фильтрах из стекловолокна .....	51
2.4.3 Оценка продукции виолацеина в биопленках хромобактерий.....	51
2.4.4 Использование иммунологических планшетов.....	52
2.4.5 Конфокальная микроскопия биопленок.....	52
2.4.6 Проточная цитометрия биопленочных клеток <i>E. coli</i> W3110.....	52
2.4.7 Оценка антикворумной активности с использованием биосенсора <i>C. violaceum</i> CV026 .	53
2.4.8 Протеомный анализ при помощи масс-спектрометрии.....	53
2.4.9 Трансформация <i>E. coli</i> W3110 при помощи метода теплового шока.....	54
2.4.10 Определение продукции феназинов штаммами <i>P. aeruginosa</i> .....	55
2.4.11. Статистическая обработка результатов.....	55
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>56</b>
3.1 Действие антибиопленочных агентов .....	56
3.1.1 Действие 4- гексилрезорцина на биопленки модельных микроорганизмов. Снятие эффекта стимуляции биопленок азитромицином.....	56
3.1.2 Никлозамид как антибиопленочный агент.....	62

3.1.2.1 Антикворумная активность никлозамида в отношении хромобактерий и псевдомонад .....	62
3.1.2.2. Влияние никлозамида на рост биопленок грамположительных бактерий.....	67
3.1.2.3 Синергидный эффект никлозамида и азитромицина . .....	70
3.1.3 Влияние традиционных биоцидов из библиотеки Prestwick Chemical Library на рост биопленок <i>E. coli</i> .....	73
3.1.4 Антибиопленочный эффект сульфатазиола в сочетании с азитромицином .....	84
3.2 Действие пробиопленочных агентов.....	86
3.2.1 Стимуляция синтеза феназинов никлозамидом в биопленках <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	86
3.2.2 Влияние ДМСО на биосинтез виолацеина в биопленках <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	89
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>93</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>99</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>100</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>101</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>102</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### 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.

### **Цели 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. Скрининг 1280 соединений из коммерческой библиотеки Prestwick Chemical Library на предмет антибиопленочной активности 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 теоретическая значимость работы**

Впервые удалось устранить стимулирующее действие сверхнизких концентраций антибиотика-азитромицина при помощи традиционных консервантов и лекарственных препаратов (4-гексилрезорцина, никлозамида, сульфатаизола) 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 сульфатаизола 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 *S. violaceum*.

### **Практическая значимость работы**

Полученные данные позволяют сделать рекомендации для применения указанных 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 формирования зубных бляшек. Доказанная эффективность нескольких препаратов из библиотеки Prestwick Chemical Library против биопленок уропатогенных штаммов *E. coli* делает их возможным для лечения и профилактики инфекций урогенитального тракта. Использование диметилсульфоксида для стимуляции синтеза виолацеина и никлозамида для стимуляции синтеза феназинов может найти применение для улучшения технологии производства указанных соединений.

### **Личный вклад соискателя**

Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей и тезисов конференций.

### **Основные положения и результаты, выносимые на защиту**

1. Впервые с помощью веществ с антибиопленочным действием – 4-гексилрезорцина и никлозамида разработан способ устранения стимуляции роста микробных биопленок сверхнизкими концентрациями антибиотика-азитромицина, которая осложняет антибактериальную химиотерапию.

2. Впервые показана возможность применения клиохинола в качестве антибиопленочного агента в отношении уропатогенных штаммов *Escherichia coli*. Обнаружен антибиопленочный эффект у ряда перспективных традиционных лекарственных препаратов, производящихся в промышленных масштабах: 4-гексилрезорцина, никлозамида, а также у некоторых сульфаниламидов.

3. Показана возможность синергидного антибиопленочного действия перечисленных широко используемых в медицине и биотехнологии соединений в сочетании с антибиотиком азитромицином. Впервые установлено пробиопленочное действие диметилсульфоксида и

никлозамида, вызывающих стимуляцию биосинтеза биологически активных соединений в биопленках *Chromobacterium violaceum* и *Pseudomonas aeruginosa*: виолацеина и феназинов, соответственно.

### **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).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и включает 31 рисунок и 5 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (2 главы), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 237 наименований.

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

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

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.б.н., профессору Плакунову Владимиру Константиновичу за поддержку и внимание на всех этапах работы. Автор благодарен сотрудникам группы Плакунова В.К. 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 предоставление и 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 Synmikto Наталии Тетеновой за плодотворное сотрудничество и новые научные идеи.

**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. doi: 10.1128/AEM.01113-20.

***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

био пленок // 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 био пленок 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Краткая история «биофильмологии» и её текущее состояние. Проблема применения антибиотиков

«Биопленки – это пространственно и метаболически структурированные сообщества микроорганизмов, погруженные во внеклеточный полимерный матрикс, и расположенные на границе раздела фаз» (Николаев, Плакунов, 2007). Это определение можно применить, как к прокариотным, так и грибным, а также смешанным консорциумам. Поскольку биопленки являются преобладающей формой существования микроорганизмов в природе, важность их изучения, с одной стороны, обусловлена интересами микробной экологии и биотехнологии (Ножевникова с соавт., 2015), с другой – медицинской микробиологии. История изучения прокариот в составе микробных сообществ восходит к работам исследователей, заложивших основы экологии микроорганизмов. Еще С.Н. Виноградским и Н.Г. Холодным впервые было отмечено, что бактерии, растущие на стекле, отличались от культивируемых в водной фазе. Прикрепленный образ жизни микроорганизмов в составе биопленок становится предметом особого внимания исследователей примерно с середины XX века. Заслуживает внимания пионерская работа Клода Зобелла (Zobell, 1943), посвященная адсорбции питательных веществ на стеклянных поверхностях, и, как следствие, росту на них микробных биопленок. В тот же исторический период получены первые сведения о факторах адгезии микробных клеток, в частности, связанных с морфологией клеток и жгутиками. Им предшествовала разработка методов учета морских микроорганизмов на поверхностях стекол обрастания. Таким образом, экспериментальная работа с микробными биопленками начинается уже в середине 30-х годов, хотя предположение о наличии особого фенотипа у «прикрепленных» бактерий, и «чувстве поверхности» высказывалось и ранее (Høiby, 2017).

В 70-х годах XX в, после первого применения электронной микроскопии для изучения биопленок (Jones et al., 1969), появляются методы окрашивания матрикса биопленок, а также первые сообщения об устойчивости микроорганизмов в их составе к биоцидам. Однако подлинный расцвет «биофильмологии» начинается с работ Уильяма Костертон (1934-2012 гг.). Предметом его исследований являлась проблема хронических инфекций у людей с искусственными имплантатами. Было показано, что биопленки патогенов во много раз более устойчивы к антибиотикам, а также иммунной системе человека. Такая устойчивость связана как с наличием внеклеточного полимерного матрикса, так и особым фенотипом клеток в биопленках, в частности, с замедленным метаболизмом. Сам термин «биопленки (biofilms)», в современном понимании, также был введен Костертоном в 1978 г (Costerton et al., 1978).

Примерное с этого времени исследование биопленок для задач экологии, биотехнологии и медицины идет в основном параллельно. С конца XX века и по настоящее время изучены процессы первичной адгезии клеток к поверхности, бактериальные адгезины. Доказано наличие у клеток последующей стадии необратимой адгезии, на которой происходит формирование биопленочного фенотипа. Подробно исследован и сам биопленочный фенотип: ответственные за его формирование гены, состав внеклеточного матрикса и т. д. В силу особой устойчивости клеток патогенных микроорганизмов в составе биопленок к антимикробным препаратам, наибольшее количество работ по данной тематике тесно связано с медициной. К настоящему моменту, в силу расширения методической базы и накопления громадного количества сведений о биопленках назревает необходимость в интеграции этих знаний на стройной теоретической платформе. Изучение биопленок является уже предметом не только отдельных групп и лабораторий, но крупных исследовательских центров, таких как Center for Biofilm Engineering при Университете штата Монтана, США; центр исследования биопленок при Университете Дуйсбург-Эссен, Германия; Costerton Biofilm Center при университете Копенгагена, Дания.

Термин «управление формированием биопленок» может иметь широкую и узкую трактовки. В узком смысле под ним следует понимать специфическое воздействие на микробную биопленку химическим агентом для предотвращения или стимуляции её формирования на определенной стадии. В широком смысле термин включает также модификацию поверхностей имплантатов и технологических конструкций для предотвращения микробного обрастания, а также ряд методов механического удаления, химической отмычки зрелых биопленок с поверхности или её стерилизации. Несмотря на условность такого разделения, а также сочетание двух групп подходов, например, применение липосом с антибиотиком в сочетании с ультразвуком (Donlan et al., 2008; Carmen et al., 2004; He et al., 2011), в дальнейшем мы будем придерживаться в основном узкой трактовки этого термина, то есть будем понимать его как специфическое воздействие на рост микробной биопленки с целью предотвращения или стимуляции её роста.

Формирование биопленки проходит несколько стадий, которые резюмированы в обзоре Плакунова и соавторов (2017): « (1) первичная адсорбция микробных клеток на поверхности раздела фаз, определяемая физико-химическими силами, или формирование агрегатов внутри жидкой фазы, контролируемое процессами коагрегации моно- и мультивидовых биопленок, (2) обратимая адгезия микробных клеток на биологических или абиотических поверхностях; (3) необратимая адгезия микробных клеток (или проникновение их внутрь тканей многоклеточного организма); (4) созревание биопленок и, наконец, (5)

стадия дисперсии с освобождением микробных клеток в окружающую среду» (Плакунов с соавт., 2017). К настоящему моменту существуют подходы для управления формированием микробных биопленок на каждой стадии, которые мы кратко рассмотрим в дальнейшем. Затем будет рассмотрена собственно проблема модуляторов роста биопленок: определение, текущее состояние проблемы и возможность новых подходов.

Наибольшее внимание уделяется борьбе с нежелательным формированием микробных биопленок. Это не удивительно: микроорганизмы в составе биопленок в десятки и сотни раз устойчивее к биоцидам, чем планктонные культуры. Причиной такой резистентности служит как наличие внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) (Стрелкова с соавт., 2013; Shields et al., 2013), так и наличие особого биопленочного фенотипа, предполагающего также присутствие в биопленке клеток-персистеров (Плакунов с соавт., 2010). Поэтому актуальным является поиск различных модуляторов роста биопленки, которые и будет рассмотрены в последующих частях обзора.

Одним из способов повышения эффективности терапии биопленочных инфекций является метод «антимикробного замка» (antimicrobial lock treatment, ALT). Он предназначен для подавления формирования биопленок, растущих на катетерах, вводимых в центральные вены (ЦВК). Несмотря на то, что метод разрабатывался еще в 80-х годах, лишь в последние два десятилетия он переживает свое «второе рождение», поскольку стало очевидным его преимущество именно против биопленочных инфекций. Суть его в том, что в уже внедренный катетер по капле добавляют растворы антимикробного агента, причем объем должен быть таким, чтобы антибиотик вовлекался в кровоток как можно медленнее, и заполнял люмен. Концентрация агента должна сохраняться в люмене продолжительное время. Сначала метод не давал существенных результатов, но затем с помощью более высоких концентраций антибиотиков (концентрации гентамицина и ванкомицина при введении составляли 5 мг/мл, далее они сохранялись на уровне 2.5 мг/мл в течение 8-12 ч) удалось добиться исчезновения биопленок. При этом тип системного антимикробного агента и его доза зависят от патогена. Так, ванкомицин используют в основном против грамположительных бактерий; против *Staphylococcus epidermidis* применяли также цефазолин, эритромицин, клиндамицин, нафциллин; против грамотрицательных бактерий амикацин, мезлоциллин и ципрофлоксацин. Для некоторых сочетаний антибиотиков «время пребывания» нужной концентрации (dwell time) можно растянуть до 7-14 дней.

С целью найти нужные комбинации антимикробных агентов за последние два десятилетия проводилось множество экспериментов *in vitro*, с использованием техники ALT. Работы, проводимые на *S. epidermidis* показали, что для исчезновения биопленок необходимо

либо повышать время контакта антимикробного агента с поверхностью, либо подбирать сочетания с другим антимикробным агентом. Первое обстоятельство связывают с тем, что гликопептидные антибиотики, ингибирующие рост клеточной стенки бактерий, действуют менее эффективно при замедленном росте клеток в биопленках; кроме того, проникновение такого агента через полисахаридный матрикс крайне затруднено. В этом случае против грамположительных бактерий целесообразнее подбирать ингибиторы белкового синтеза (линезолид), ингибиторы РНК-полимеразы (рифампицин), синтеза ДНК (ципрофлоксацин). Несколько противоречивые результаты получены для грамотрицательных бактерий. Так, показано (Curtin et al., 2003), что аминогликозидный антибиотик гентамицин полностью разрушает биопленки *Klebsiella pneumoniae* за 1 сутки, в то время как большинство гликозидов неэффективны против биопленок. Этот факт, по-видимому, связан с быстрым действием препарата в сочетании с высокой концентрацией в эксперименте. Параллельно с задачей подбора необходимых антимикробных агентов стоит вопрос о сочетании таковых с различным механизмом действия. Kandemir и соавторы выращивали биопленки *P. aeruginosa* на силиконовых трубках, введенных в медуллярный канал крыс в течение 14 суток (Kandemir et al., 2005). Далее одна группа животных подвергалась лечению цефтазидимом, крысам второй группы, помимо цефтазидима, вводили кларитромицин, третья группа животных была контрольной. После 20 суток лечения оказалось, что комбинирование с кларитромицином существенно снижает уровень формирования биопленок. Преимущества такого подхода в том, что он позволяет устранить появление резистентных штаммов, а также преодолеть защиту в виде полисахаридного компонента матрикса. Наглядным примером является антибиотик рифампицин, применяемый против стафилококков и микобактерий, обладающий быстрым действием, но вызывающий появление устойчивых штаммов. Комбинирование его с ванкомицином и цефазолином решает эту проблему. Кроме того, рифампицин легко проникает через полисахаридный матрикс, что повышает эффективность сочетаемых с ним агентов. В целом применение метода ALT для борьбы с биопленками выглядит перспективным, однако существует необходимость его улучшения. Так, в период до 2013 года методу ALT было посвящено 98 статей, из них лишь 17 из них были посвящены оптимизации метода (Bookstaver et al., 2013). Интересно, что для предотвращения микробной колонизации можно использовать не только антибиотики, но например, этанол или цитрат (Noelting et al., 2018).

Другие подходы основаны на целенаправленной доставке антибиотика к мишени в заданной концентрации, что, несомненно, повышает эффективность подавления антибиотиками роста биопленок. В качестве примера можно привести использование

липосом. Для большей эффективности липидный слой липосомы можно модифицировать. Например, можно добиться специфичности путем ковалентного присоединения конканавалина А – лектина, способного взаимодействовать с  $\alpha$ -маннопиранозильными и  $\alpha$ -глюкопиранозильными остатками, которые могут быть обнаружены во внеклеточном полисахаридном матриксе некоторых биопленок (Strathmann et al., 2002). Показана эффективность модифицированных антителами иммунолипосом с хлоргексидином и триклозаном против биопленок *Streptococcus oralis*, образующего зубные бляшки *in vitro*. Немаловажную роль играет и подбор включаемого в состав липосом антибиотика. Так, включенные в состав липосом ципрофлоксацин и меропенем проявляли бактерицидную активность ниже минимальных ингибирующих концентраций (МИК), определенных для этих антибиотиков в свободном виде. В то же время для включенного в состав липосом гентамицина показаны более высокие значения МИК, чем в свободном состоянии. Связано это с тем, что меропенем является амфифильным соединением, которое может легко проникать через бактериальную внешнюю мембрану, в то время как ионное взаимодействие между липосомой и поверхностью бактериальной клетки обеспечивает попадание меропенема непосредственно в периплазму в высокой концентрации. В то же время ингибитор синтеза белка гентамицин является водорастворимым. Для его транспортировки необходимо ионное взаимодействие с поверхностью бактериальной клетки, сила которого зависит от состава и структуры липополисахаридного слоя, и прямое взаимодействие инкапсулированного препарата с поверхностью клетки невозможно (Martin et al., 2015). Наконец, липосомы можно стабилизировать добавлением растворимого полимера, например, полиэтиленгликоля (ПЭГ) (Jesorka, Orwar, 2008). Препарат на основе хитозанового геля, содержащий липосомы с мупирицином, можно использовать для предотвращения биопленочных инфекций при ожогах (Hurler et al., 2013), хотя авторы отмечают его большую эффективность и против планктонных микроорганизмов.

Помимо липосом, для целенаправленной доставки антибиотиков можно использовать твердые липидные наночастицы (solid lipid nanoparticles, SLN). Они представляют собой субмикронные дисперсии твердых липидов в водных средах, которые могут использоваться для доставки как гидрофильных, так и липофильных препаратов, включая низкомолекулярные соединения, пептиды и белки. SLN получают из твердых липидов (например, триглицеридов, жирных кислот, восков), эмульгаторов (например, лецитина, полоксамеров, солей желчных кислот) и воды, что делает их минимально токсичными и биосовместимыми, так как они лишены остатков органических растворителей. Несмотря на то, что противомикробные препараты в составе SLN мало активны против зрелых

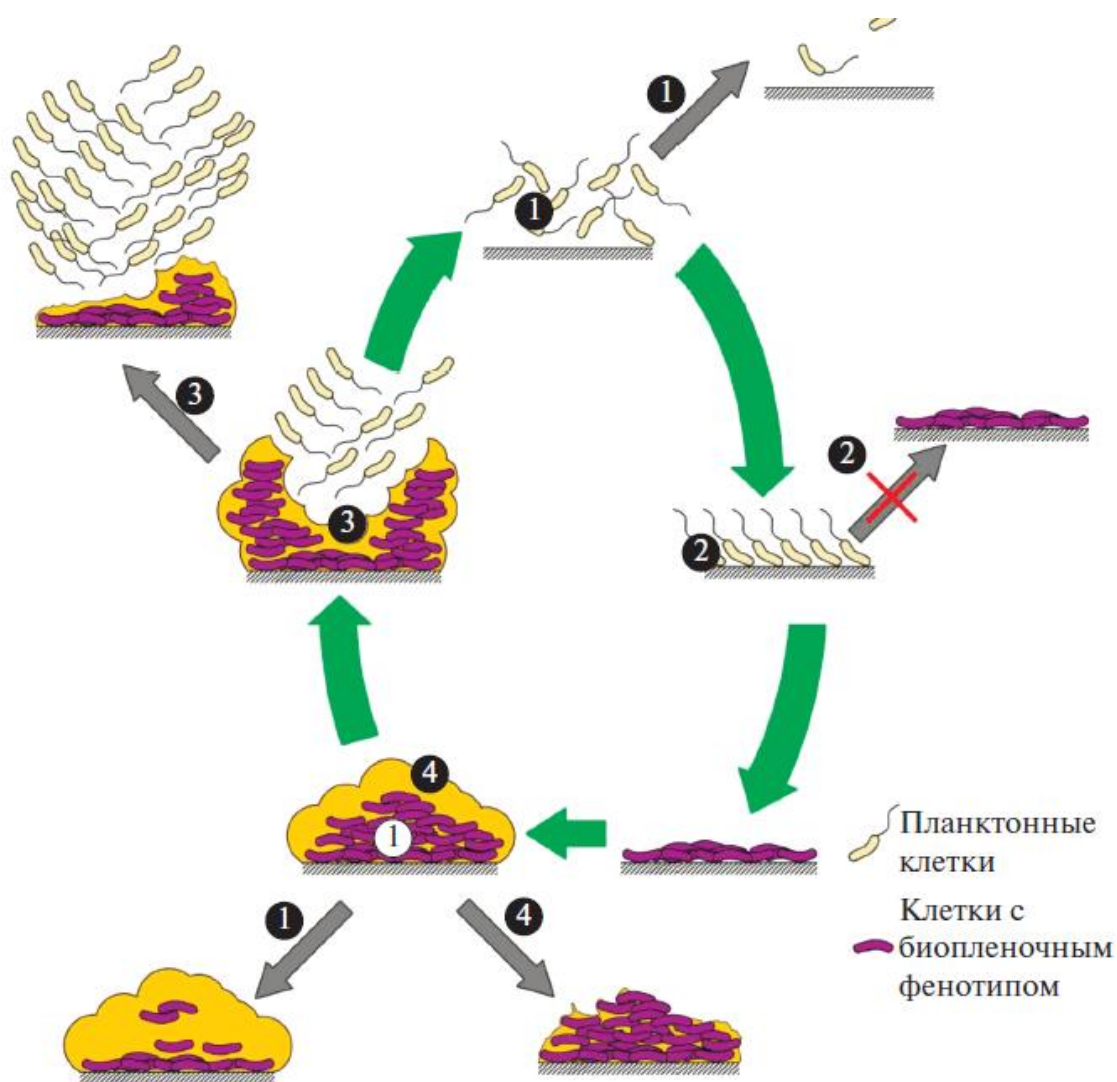


био пленок, показана эффективность их применения против самых различных инфекций (Cavalli et al., 2002; Wang et al., 2012). Модифицируя липидный состав таких частиц, можно добиться увеличения среднего времени удержания препарата на 10 ч (Kim et al., 2010).

Эффективность противомикробной терапии можно повысить путем применения микроэмульсий. Они могут иметь самое различное соотношение липидной и водной фаз и включать в себя амфифильные антимикробные препараты. Более того, в их составе можно использовать вещества, не относящиеся к традиционным биоцидам. Например, в работе Donsi с коллегами (Donsi et al., 2012) была показана противомикробная активность самых различных эмульсий на основе подсолнечного масла, с добавлением карвакрола, лимонена и коричневого альдегида (противомикробных компонентов эфирных масел), и стабилизированных целым рядом эмульгаторов.

## 1.2 Воздействие на адгезию и начальные этапы формирования микробных биопленок

Степень адсорбции клеток мало зависит от химического состава поверхности и, в основном, определяется гидродинамическими и электростатическими взаимодействиями. В то же время для управления адгезией клеток существует ряд методов, большей частью неспецифических. Последние, в частности, основаны на модификации применяемых в медицине полимеров с целью улучшения их антиадгезивных свойств. В основе таких полимеров лежат производные полиэтиленгликоля (ПЭГ) и полиэтиленоксида (ПЭО). Противомикробные свойства можно усиливать за счет иммобилизации наночастиц металлов, и других биоцидов. Эти методы рассмотрены в обзорах (Hasan et al., 2013; Beloin et al., 2014; Yu et al., 2015). Их подробное рассмотрение выходит за рамки нашего обзора. Гораздо больший интерес для нас представляет специфическое воздействие на синтез адгезивных структур клетки. В процессе обратимой адгезии одну из главных ролей играют клеточные структуры, как специфические (курли у *Escherichia coli* (Besharova et al., 2016), «хами» у архей (Perras et al., 2015)), так и неспецифические, такие как жгутики (Friedlander et al., 2015) и пили первого типа (Schembri, Klemm, 2001). Эти структуры содержат молекулы адгезинов. Ингибирование синтеза адгезинов представляет большой интерес для медицины, так как они играют ключевую роль в патогенезе, обеспечивая колонизацию патогена на поверхности эпителиальных клеток. Так, уропатогенные штаммы *E. coli* адгезируются к клеткам эпителия хозяина при помощи пилей типа I, на кончике которых содержится адгезин FimH. Адгезия происходит за счет связывания адгезина с терминальными остатками  $\alpha$ -D-маннопиранозильными остатками. Поэтому перспективной является стратегия поиска ингибиторов этой связи. Показано, что тритиоманнозид (Khanal et al., 2014), иммобилизованный на наночастицах, снижает адгезию клеток уропатогена к клеткам мочевого пузыря. В последние годы значительное количество работ посвящено этой проблеме, для ингибирования адгезина FimH уже разработан метод рационального драг-дизайна (данные суммированы в обзоре (Krammer et al., 2018)).



**Рисунок 1** — Общая схема действия антибиопленочных агентов на разных этапах формирования микробной биопленки (Плаунов с соавт., 2019). Различные классы обозначены цифрами: 1 – агенты, предотвращающие адгезию клеток, 2 – агенты, ингибирующие созревание микробной биопленки, 3 – агенты, стимулирующие дисперсию клеток из зрелой биопленки, 4 – ингибиторы синтеза внеклеточного матрикса.

Показана возможность подавления лектинов LecA (PA-II) и LecB (PA-III) – факторов вирулентности и образования биопленок для *Pseudomonas aeruginosa* – путем подбора ингибиторов, разных по своей химической природе. Поскольку эти адгезины представляют собой гликопротеиды, возможно присоединение как мимикрирующих под аминогликозид молекул, так и модификация самого белка. Первый путь показан для лектина LecB: амид коричной кислоты, а также сульфонамиды обладают сильным ингибиторным эффектом против биопленок *P. aeruginosa* (Hauck et al., 2013). Вторым путем можно ингибировать активность углеводов-связывающего домена LecA за счет модификации цистеинового остатка производными галактозы (Wagner et al., 2017).

Антиадгезивными свойствами могут обладать и полисахариды-биосурфактанты, в том числе и выделенные из других микроорганизмов. В статье Rivardo с коллегами (Rivardo et al.,

2009) описаны антибиопленочные свойства двух биосурфактантов, вырабатываемых галотолерантными штаммами *Bacillus subtilis* и *B. licheniformis* при росте на 10 % NaCl, в отношении биопленок *E. coli* и *S. aureus*. Авторы объясняют эти свойства тем, что биосурфактант связывается с мембраной клетки и изменяет её гидрофобность. В работе (Sotirova et al., 2008) продемонстрирована способность рамнолипидного бисурфактанта увеличивать проницаемость клеток. Предположительно, этот процесс протекает по-разному у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Биосурфактанты также могут способствовать дисперсии биопленки.

Представляет интерес использование антител для специфического связывания с адгезивными белками. Так, например, «моноклональные антитела к поверхностному адгезину Aap *S. epidermidis*, обеспечивающему фиксацию стафилококков в биопленках, подавляли биопленкообразование» (Чеботарь, 2012). Более того, вакцина SesC разработана к соответствующему поверхностному антигену, что делает данный препарат эффективным против биопленок *S. epidermidis*. Эти данные обобщены в обзоре (Чеботарь, 2012).

### 1.3 Ингибиторы созревания биопленок

В процессе созревания биопленок ведущую роль играют два типа систем глобальной регуляции метаболизма: системы «чувства кворума» (QS) и системы, зависящие от уровня циклического дигуанозинмонофосфата (с-di-GMP) в клетке. Для начала рассмотрим ингибиторы систем QS (QSI).

#### 1.3.1 Ингибиторы бактериального «чувства кворума» (QSI)

##### 1.3.1.1 Краткий обзор бактериальных систем QS

Большинство сигнальных факторов QS представляют собой производные ацилгомосеринлактона (acylhomoserine lactone, (АГЛ)), также называемые автоиндукторами первого типа (АИ-1)). Впервые они обнаружены у *Vibrio fischeri*, а в настоящее время найдены у грамотрицательных бактерий ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -протеобактерий, Irie, Parsek, 2008), таких как *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Nitrosomonas*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Vibrio*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* (Eberl, 1999).

АГЛ-система состоит из следующих компонентов: молекула гомосеринлактонового производного, LuxI-подобная сигнальная синтаза, LuxR-подобный сигнальный рецептор и регулируемые им гены. К последним могут относиться гены, ответственные за продукцию факторов вирулентности и образования биопленок. В ряде случаев система включает также специальные мембранные насосы для транспорта длинноцепочечных гомосеринлактонов

(Evans et al., 1998; Pearson et al., 1999). В клетках *E. coli* имеется рецептор SdiA, который может связываться с АГЛ, поступающими от других бактерий в данной экосистеме. *P. aeruginosa* имеет три АГЛ-опосредованных сигнальных пути, различающихся по сигнальным молекулам и конечным рецепторам: LasRI, RhRI, PQS. Первая система имеет в качестве активатора 3-оксодеканоил-L-гомосеринлактон, вторая – бутаноил-гомосеринлактон, третья, вспомогательная – 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон (*pseudomonas quinolone signal*, (PQS), см. далее). При достижении популяцией определенной плотности сигнальная молекула связывается с рецептором. В результате белок-рецептор АГЛ приобретает необходимую конформацию для связывания с ДНК и запуска транскрипции QS-зависимых генов, в том числе и *luxI*. Таким образом, происходит лавинообразное нарастание концентрации сигнальных молекул в среде. Аналогичный механизм характерен для других QS-систем.

Другой распространенной системой QS является автоиндуктор-2-зависимая система (auto-inducer 2, AI-2-dependent system), найденная у некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий. На присутствие второй системы QS у *V. harveyi* указывал факт биолюминесценции у мутанта с неработающей АИ-1 системой (Bassler et al., 1994, цит. по Bhardwaj et al., 2013). Ключевой этап биосинтеза АИ-2 катализируется высоко консервативным ферментом S – рибозилгомоцистеиназой (LuxS), обнаруженным более, чем у 70 видов бактерий (Sun et al., 2004). Молекула АИ-2 является производным от предшественника, 4,5-дигидрокси-2,3-пентадиона (ДПД, DPD). DPD синтезируется из S-аденозил-L-гомоцистеина в двухстадийной ферментативной реакции, катализируемой метилтиоаденозиннуклеозидазой Pfs и S-рибозилгомоцистеиназой LuxS. LuxS превращает S-рибозилгомоцистеин в гомоцистеин и DPD. Вне клетки DPD подвергается ряду химических перестроек (спонтанной циклизации), из-за наличия высоко реакционноспособного 2, 3 – дикарбонильного участка с образованием ряда полициклических борсодержащих фуранозидов. Показано, что *E. coli* и *S. typhimurium* могут «перехватывать» и разлагать АИ-2 молекулы других видов бактерий (Xavier, Bassler, 2005; Asad, Opal, 2008; Lowery et al., 2008), во втором случае, в этом процессе задействована LuxS-регулируемая транспортная система (Lsr). Этот факт, а также большое структурное разнообразие сигнальных молекул указывают на участие АИ-2 системы в межвидовой коммуникации (Schauder et al., 2001; Xavier, Bassler, 2005; Lowery et al., 2008). За рецепцию и активацию транскрипции отвечает двухкомпонентный белковый комплекс (рецептор + киназа). У *V. harveyi* это связанный с мембраной LuxPQ комплекс. Домен LuxP связывает сигнальную молекулу, LuxQ имеет киназо-фосфатазную активность в зависимости от приобретаемой конформации. У

энтеробактерий рецептор находится в периплазме, в этом случае сигнальная молекула перемещается внутрь клетки при помощи ABC-системы транспорта. Далее, после связывания DPD-производное фосфорилируется и взаимодействует с внутриклеточным рецептором, запускающим транскрипцию определенных генов.

Для энтеропатогенных бактерий описана система третьего типа (АИ-3), детально изученная для энтерогеморрагического штамма *E. coli* ЕНЕС. Она играет значительную роль в патогенезе энтерогеморрагических штаммов *E. coli* (ЕНЕС) и *Shigella*. Детальное её строение изучено у *E. coli* ЕНЕС. В периплазме этой патогенной бактерии имеется комплекс QseBC, регулирующий активность генов биосинтеза жгутика. Также QseBC отвечает за рецепцию АИ-3, и гормонов человека: эpineфрина и норэpineфрина. Сигнальные молекулы для этой системы предположительно имеют ароматическую природу (Kendall, Sperandio, 2014) и, возможно, структурно сходны с вышеупомянутыми гормонами. QseC является сенсорной киназой, QseB – отвечающим на воздействие регулятором. Транскрипция генов, ответственных за лизис энтероцитов (locus of enterocyte effacement, LEE), находится под контролем QseA. Ввиду того, что гомологичные ферменты найдены у других энтеробактерий, АИ-3-система также может использоваться для межвидовой коммуникации.

На специализацию АИ-3 системы для патогенеза указывает факт транскрипции генов LEE у мутантов *E. coli* с неработающим геном *luxS* в присутствии очищенных эpineфрина и норэpineфрина. В то же время добавление экзогенных АИ-2-молекул к таким мутантам никак не влияет на этот процесс (Kendall et al., 2007).

В межклеточной коммуникации грамположительных бактерий важную роль играет пептидная система (Bhardwaj et al., 2013). Сигнальными молекулами служат циклические аутоиндукторные пептиды (autoinducing peptides, AIPs, АИП). У *S. aureus* имеется четыре типа АИП. Каждый пептид состоит из циклической «головой» и нециклического «хвоста». По их типу вид разделяют на четыре физиологические группы. Сигнальные пептиды синтезируются из пропептидов, затем подвергаются модификации перед секрецией через транспортную систему. У стафилококков, а также у *Enterococcus faecalis*, обнаружен пропептид AgrD, который расщепляется пептидазой AgrB. С мембраной связан рецептор – гистидиновая киназа AgrC (Novick, Geisinger, 2008). При связывании им олигопептида происходит каскад реакций автофосфорилирования вплоть до модификации активатора транскрипции AgrA. Среди генов, запускаемых данной системой, находятся гены вирулентности.

В заключение следует упомянуть вспомогательные системы, характерные для грамотрицательных бактерий, например, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Burkholderia*. Так, у *P. aeruginosa* обнаружены PQS-система (pseudomonas quinolone signal, (PQS)), с использованием в качестве сигнальной молекулы 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона, и дикетопиперазиновая (DKP)-система. Для патогена человека и насекомых *Photorhabdus asymbiotica* обнаружены новые сигнальные молекулы, распознаваемые белковым рецептором для системы первого типа (АГЛ-зависимой), относящиеся к классам диалкилрезорцинов (DARs) и циклогександионов (CHDs) (Brameyer et al., 2015).

Стратегии ингибирования систем QS нацелены на: ингибирование рецепторов сигнальной молекулы, ингибирование их биосинтеза, а также на деградацию их в окружающей среде. Далее рассмотрим каждый из этих подходов подробнее.

### 1.3.1.2 Ингибиторы рецепторов сигнальных молекул QS

Данная стратегия в наибольшей степени разработана для АГЛ-зависимой системы QS. Ряд исследований, проводимых во второй половине 90-х годов, обнаружил структурно-функциональную взаимосвязь молекул АГЛ, что послужило стимулом для поиска новых ингибиторов QS. Показано, что решающую роль в активности сигнальной молекулы играет длина углеродной цепи ацильного радикала. Эти данные обобщены в обзоре (Neoh, Kang, 2011) Так, увеличение длины цепи на одну метильную группу снижает активность сигнальной молекулы на 50%, удлинение цепи на 2 атома углерода – на 90%. Удаление метильной группы снижает активность на 10%. Следовательно, наиболее перспективными являются ингибиторы с большей длиной боковой цепи. Интересно, что стереоизомерия ацильного «хвоста» молекулы автоиндуктора также влияет на ингибирование. Например, обогащение молекулы ненасыщенными связями делает взаимодействие с рецептором невозможным. Модификации можно подвергать лактонные кольца молекулы. Так, например, показано наличие ингибиторной активности у более стабильных тиолактонов в отношении биопленок *P. aeruginosa* (O'Loughlin et al., 2013). Возможно использовать D-изомеры промежуточных продуктов синтеза (см. выше) вместо L-изомеров, а также лактонные кольца, лишенные радикалов. Ряд высших организмов, особенно растения, также способны синтезировать аналоги гомосеринлактонов, например *Medicago truncatula* (Gao et al., 2003). Экстракты семян этого растения содержат вещества, структурно похожие на АГЛ, взаимодействующие с рецепторами за счет молекулярной мимикрии (см. § 1.5.2). Актиномицеты рода *Streptomyces* могут выделять  $\gamma$ -бутиролактоны, которые, связываясь с рецептором, стимулируют образование стрептомицина и антрациклинов (Takano et al., 2000).

Ингибиторный эффект ряда известных QSI объясняется их структурной аналогией с АГЛ, т. е. молекулярной мимикрией (Ren et al., 2001). Таковы, например, фураноны – вторичные метаболиты растений, впервые выделенные из макрофитной красной водоросли *Delisea pulchra* (Manefield et al., 1999; Zhang, 2003), таллом которой не подвержен биообрастанию. Первоначально противобиопленочный эффект фуранонов объяснялся конкурентным связыванием с рецептором. Однако, другие исследования говорят о том, что эти вещества непосредственно ингибируют транскрипцию QS-зависимых генов. Показано, что бромированные фураноны и их производные обладают ингибирующей активностью против биопленок *P. aeruginosa* (Hentzer, Givskov, 2003, цит. по Janssens et al., 2008), *E. coli* (Ren et al., 2004), *B. subtilis* (Ren et al., 2002). Lowery et al. показали, что фураноны дестабилизируют связь активатора транскрипции LuxR с ДНК у *V. fischeri* и *V. harveyi*. Однако другие исследования говорят об ингибировании фуранонами и планктонных культур, особенно грамположительных бактерий (Kayumov et al., 2014; Trizna et al., 2015). К настоящему моменту данные о противокворумной активности фуранонов противоречивы, и система QS, предположительно, является для них лишь одной из мишеней (Sharafutdinov et al., 2019).

В отношении системы АИ-2 показана эффективность производных DPD. Наиболее мощным ингибирующим эффектом обладают С1-алкил производные АИ-2, включая изобутил-DPD и фенил-DPD (Roy et al., 2012). Более того, показано, что фенил-DPD может блокировать QS-опосредованный синтез токсина пиоцианина у *P. aeruginosa*. Этот микроорганизм использует молекулы АИ-1 для межклеточной коммуникации, а экспрессия соответствующих генов регулируется АИ-2, который вырабатывается окружающей микрофлорой. Показано (Ganin et al., 2009), что С2-алкильные производные АИ-2 могут снижать продукцию токсина пиоцианина. АИ-2 фосфорилируется киназой LsrK, далее инактивирует репрессор цикла LsrR, связываясь с ним, освобождая таким образом оперон *lsr* и давая возможность экспрессироваться генам QS. Изобутил-DPD также фосфорилируется киназой, но, наоборот, стабилизирует репрессор, препятствуя, в итоге, возможности образования стабильных биопленок.

Для ингибирования системы АИ-3, согласно данным (Rasko et al., 2008) перспективным может представляться ингибитор LED 209 (N-фенил-4-(((фениламино)-тиооксометил)амино)-бензенесульфоамид). Авторами был проведен скрининг более 150 малых молекул в отношении активности киназы QseC. LED 209 ингибирует процесс автофосфорилирования, опосредованный QseC, препятствуя таким образом экспрессии



вирулентных генов у *E. coli*, *S. typhimurium*, *Francisella tularensis*. LED 209 нетоксичен для организма хозяина, и не влияет на рост бактерий.

Работы по изучению систем QS грамположительных бактерий с целью ингибирования ведутся с конца 90-х годов. В работе (Mayville et al, 1999) показано, что сигнальный пептид приобретает ингибиторные свойства при замене аминокислотного остатка в хвостовой части. Эксперименты с «усеченным» АИП, в котором отсутствовала хвостовая часть, позволили выдвинуть гипотезу, что именно кольцевая часть сигнальных пептидов ответственна за связь с рецептором (Lyon et al., 2000), в то время как нециклический «хвост» отвечает за активацию AgrC и передачу сигнала. Эта гипотеза была подтверждена в дальнейшем (McDowell et al. 2001; Wright et al. 2004; Tal-Gan et al. 2013), что привело к появлению ряда работ по модификации АИП, поскольку стали известны ключевые аминокислотные позиции, определяющие специфичность пептида для одной группы, или для всех групп. путем замены одной аминокислоты на другую (McDowell et al., 2001; Johnson et al. 2015), или использования антител для создания гаптена (Park et al., 2007)

#### 1.3.1.3 Ингибирование синтеза сигнальных молекул

В основе данного подхода лежит ингибирование ферментов, ответственных за синтез сигнальных молекул, путем применения структурных аналогов их предшественников или других ингибиторов.

Последовательность реакций синтеза АГЛ включает участие S-аденозилметионина (SAM) как донора аминогруппы для образования «половины» лактонного кольца, и заряженного ацил-переносящего белка (acyl carrier protein, ACP). В связи с этим целесообразно использовать в качестве ингибиторов различные аналоги SAM, такие как S-аденозилмоноцистеин, S-аденозилцистеин, синефунгин (Rasmussen, Givskov, 2006). Показано (Parsek et al., 1999), что вышеперечисленные вещества проявляют ингибиторные свойства в отношении активности белка RhlI *P. aeruginosa*. Ингибиторы фермента метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин нуклеозидазы успешно зарекомендовали себя при лечении болезни Лайма (Parveen, Cornell, 2011). Несмотря на то, что SAM является важным интермедиатом многих метаболических путей у про-, и эукариот, опосредуемая им реакция синтеза АГЛ у прокариот считается уникальной. В связи с этим возможно использование его химических аналогов как специфических ингибиторов QS, устойчивых к эукариотическим ферментам, для которых SAM является субстратом. Также известно (Tateda et al., 2004, Skindersoe et al., 2008), что некоторые антибиотики способны ингибировать синтез АГЛ при минимальной подавляющей рост концентрации. В частности, эксперименты *in vivo* на *P. aeruginosa* показывают, что азитромицин блокирует систему QS, и ингибирует синтез

альгината (Hoffmann et al., 2007). Авторы предполагают, что блокировка системы QS является следствием ингибирования синтеза белка, кроме того, азитромицин препятствует полимеризации альгината. Другой мишенью может выступать FabI (NADH-зависимая еноил-АСР-редуктаза) – фермент, ответственный за катализ конечной стадии биосинтеза ацильного хвоста молекул АГЛ. Было показано (Hoang, Schweizer, 1999), что FabI участвует в образовании бутирил-АСР, который используется клеткой для синтеза C<sub>4</sub>-АГЛ. Известно, что семейство короткоцепочечных алкогольдегидрогеназ, к которым относится и этот фермент, ингибируется антибактериальными диазаборином и триклозаном (Hoang, Schweizer, 1999).

Аналоги SAM также можно использовать для ингибирования биосинтеза сигнальных молекул системы АИ-2. Есть данные, что ранее упомянутые галоидированные фураноны ковалентно связываются с LuxS, подавляя активность фермента (Zang et al., 2009). Активность LuxS также подавляется S-ангидрорибозил-l-гомоцистеином и S-гоморибозил-l-цистеином. Другой мишенью для ингибирования АИ-2 системы QS является нуклеозидаза MTAN (Pfs), для которой также подобраны многочисленные ингибиторы на основе природных субстратов. Эти данные обобщены в обзоре (LaSarre, Federle, 2013).

В отношении грамположительных бактерий возможность ингибирования синтеза сигнальных пептидов изучена на примере *S. aureus*. Ключевую роль в биосинтезе сигнальных пептидов играют ферменты AgrV и SpsB, удаляющие лидерные последовательности с С-, и N-конца пропептида, соответственно. Особое внимание заслуживает работа (Kavanagh et al., 2007), в которой авторы синтезировали особый пептид, ингибирующий активность протеазы SpsB. Полученный ингибитор был также модифицирован авторами для большей стабильности. Однако этот пептид под названием NIF обладал заметно более выраженной антимикробной активностью, что ставит под сомнение факт избирательного ингибирования SpsB.

Наконец, следует упомянуть о возможности ингибирования PQS-зависимой системы у псевдомонад. Ранее была открыта возможность ингибирования синтеза 3-гидрокси-4-хинолона (PQS) метилированным производным антранилата, предшественником сигнальной молекулы (Calfee et al., 2001). Эффективность такого подхода была показана в том числе *in vivo* (Lesic et al., 2007). Однако поскольку PQS участвует не только в QS-зависимой передаче сигнала, но и в других процессах (Lin et al., 2018), нельзя сказать, что имеет место только «антикворумный» эффект ингибиторов его синтеза.

#### 1.3.1.4 Ингибирование функционирования сигнальных молекул систем QS

Данный подход основан на «деструкция или модификация готовых сигнальных молекул с помощью специфических ферментов: лактоназ, ацилаз, амидаз и оксидоредуктаз» (Плакунов с соавт., 2017). Щелочной гидролиз молекул АГЛ катализируется лактоназами AiiA, AttM, AiiB (Dong et al., 2000; Carlier et al., 2003)), AhlD (Park et al., 2003), ацилазами (AiiD (Lin et al., 2003; Sio et al., 2006)), оксидоредуктазами (Uroz et al., 2005). Введен даже специальный термин: «ферменты-выключатели кворума» (QQ-enzymes). Обнаружены также бактериальные амидазы/ацилазы, расщепляющие амидную связь в молекуле ацилгомосеринлактона с образованием жирной кислоты (Lin et al., 2003; Sio et al., 2006). Способность к ферментативной инактивации АГЛ обнаружена у ряда представителей  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -протеобактерий, а также у фирмикут (*Bacillus*), актинобактерий. Эти данные обобщены в обзорах (Uroz et al., 2009; Chen et al., 2013). Некоторые бактерии могут использовать АГЛ как единственный источник углерода и энергии. Таковы, например, изолированный из почвы штамм *Variovorax paradoxus*, использующий 3-оксо-гексил-N-гомосеринлактон в качестве единственного источника углерода и азота (Leadbetter, Greenberg, 2000), а также *Rhodococcus erythropolis* (Uroz et al., 2005), штамм *P. aeruginosa* 2SW8 (Wong et al., 2012), выделенные из ризосферы имбиря (*Zingiber officinale*), штаммы *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella* (Chan et al., 2011). Создана питательная среда для выделения АГЛ-разлагающих микроорганизмов (Chan et al., 2009), что облегчает скрининг таких бактерий. Долгое время роль вышеперечисленных ферментов оставалась неясной. Однако впоследствии было показано (Park et al., 2008), что наличие QQ-ферментов необходимо для успешной колонизации бактериями ризосферы и конкуренции с другими видами. Мутантный по гену *aiiA* штамм *B. thuringiensis* оказался неконкурентоспособным и проявлял сниженную жизнеспособность в присутствии *E. carotovora*. Поскольку АГЛ индуцируют колонизацию ризосферы бактериями, что ведет к повышению устойчивости растения к фитопатогенам, в частности, к синтезу противогрибковых соединений, масштабное функционирование QQ-ферментов ставится под сомнение. Данная тематика пока больше привлекает внимание микробных экологов, например, использование метагеномики позволяет обнаружить новые лактоназы среди некультивируемых форм (Torres et al., 2017). В одной из последних работ (Pinnow et al., 2016) на эту тему авторам удалось выделить ряд генов, кодирующих QQ-ферменты, клонировать и изучить полученные продукты в отношении противобиопленочной активности.

Хотя применение QQ-ферментов в клинической практике против биопленок выглядит пока маловероятным, тем не менее, уже изучена активность ацилазы PvdQ *in vivo* с

использованием *Caenorhabditis elegans* в качестве модельного микроорганизма (Papaioannou et al., 2009). Авторы показали, что мутантный штамм *P. aeruginosa* с повышенным выходом данного фермента был менее вирулентным, а также сообщили о его «лечебной» активности в отношении *C. elegans*, инфицированной диким штаммом. Особый акцент должен быть сделан на создании высокоспецифичных к патогенам препаратов, которые не должны наносить ущерб полезной микробиоте ризосферы (Chen et al., 2013). Особый интерес представляет возможность клонирования генов лактоназ с целью защиты последними растений от бактериальных инфекций. Экспрессия *aiiA* гена у растительного патогена *Erwinia carotovora* приводит к снижению концентрации АГЛ, и, как следствие, к понижению активности внеклеточных протеаз и прекращению развития «мягких гнилей» у растения (Dong et al., 2000).

### **1.3.2 Ингибиторы систем, зависящих от циклического дигуанозинмонофосфата**

Ц-ди-ГМФ является важным внутриклеточным вторичным мессенджером (алармоном), характерным исключительно для прокариот, а системы, зависящие от ц-ди-ГМФ, играют важнейшую роль в формировании биопленок. Синтез этого вещества катализируется дигуанилатциклазами (DGC), а деградация – фосфодиэстеразами (PDE). Высокий внутриклеточный уровень ц-ди-ГМФ – характерный признак биопленочного фенотипа, в то время как его падение ведет к переходу клетки на планктонный образ жизни (Valentini, Filloux, 2016). Вышеупомянутые ферменты могут служить мишенью для самых разнообразных соединений, поскольку играют роль сенсоров. Стратегии ингибирования ц-ди-ГМФ-зависимых систем сходны с таковыми для QS.

Рецепцию сигнала можно ингибировать, воздействуя на DGC. Был найден ряд соединений (Sambanthamoorthy et al., 2012), которые были активны против дигуанилатциклазы DGC VC2370 из *V. cholerae* и WspR из *P. aeruginosa*, а также подавляли образование биопленки у мутанта *V. cholerae* с более высокими уровнями ц-ди-ГМФ, чем у дикого типа. Два наиболее активных соединения (N-(4анилинофенил)-бензамид (DI-3) и N – {((2-фенилэтил)-амино)-карбонотиоил}-бензамид (DI-10)) были способны подавлять образование биопленок *V. cholerae*, и, кроме того, DI-3 был также эффективен против биопленок *P. aeruginosa*. Интересен тот факт, что эти вещества активны только против формирующихся биопленок в проточной системе, и не влияют на дисперсию зрелых биопленок. Antoniani с соавторами использовали весьма простой и оригинальный метод скрининга ингибиторов DGC: активность дигуанилатциклазы AdrA *E. coli* определяли с использованием мутанта с её повышенным содержанием по продукции целлюлозы (компонента биопленок). Неокрашенные колонии на среде с красителем конго красным соответствовали подавлению

активности фермента. Таким образом, авторам удалось обнаружить антибиопленочную активность сульфатазозола – традиционного бактериостатика. О новой роли традиционных биоцидов речь пойдет в последующих главах. Следует отметить, что ингибирование активности DGC сульфатазозолом происходит не напрямую, но опосредованно, путем ингибирования синтеза нуклеотидов.

Особо следует отметить работу (Furukawa et al., 2012), в которой показана возможность использования структурных аналогов ц-ди-ГМФ для связывания их с РНК-переключателями. Уже упомянутым коллективом авторов (Sambanthamoorthy et al., 2014) также показана антибиопленочная активность ряда производных ц-ди-ГМФ.

Ранее мы обсуждали возможности применения QQ-ферментов, разлагающих сигнальные молекулы QS-систем. Сходную стратегию можно применить и в данном случае, а именно, использовать соединения, образующие стабильные, неактивные комплексы с ц-ди-ГМФ, однако учитывая плохую растворимость уже известных подобных соединений, такая стратегия выглядит мало перспективной.

Главная сложность подобных работ состоит в трудности измерения количества ц-ди-ГМФ. В последние годы совершенствуются методы создания репортерных штаммов. Особенно следует отметить недавнюю работу (Yeo et al., 2018), в которой авторы проводили измерение концентрации ц-ди-ГМФ в одиночных клетках *E. coli in vivo* при помощи флуоресцентных репортеров второго поколения. Авторам удалось показать снижение уровня вторичного мессенджера при добавлении катионов цинка. Более подробно роль ц-ди-ГМФ в метаболизме микроорганизмов обобщена в недавно опубликованной монографии Chou et al., 2020)

## 1.4 Ингибирование зрелых биопленок

Данная стратегия включает в себя несколько подходов. Первым является прямое разрушение матрикса биопленки с использованием литических ферментов. В основе другого подхода лежит ускорение естественного процесса дисперсии биопленки. Наконец, отдельную группу подходов составляет борьба с клетками-персистерами в зрелых биопленках. Неспецифические методы (ультразвук, холодная плазма) выходят за рамки нашего обзора.

### 1.4.1 Использование литических ферментов

Внеклеточный полимерный матрикс составляет обычно 80-90% сухой массы биопленки. Он включает в себя полисахариды, белки, липиды, внеклеточную ДНК, и играет большую роль в устойчивости клеток к стрессовым воздействиям (Стрелкова с соавт, 2013). Именно поэтому использование литических ферментов в сочетании с антибиотиками представляется перспективным методом борьбы с биопленками. Таковыми являются гликозидазы, протеиназы, эстеразы. К последним относятся ДНК-азы, гидролизующие сложноэфирную связь в молекуле внеклеточной ДНК – важнейшего компонента матрикса биопленок, наряду с полисахаридами. Главная опасность применения литических ферментов состоит в распространении клеток патогена с током крови по организму после лизиса матрикса, и как следствие, возникновение локальных очагов инфекции. По этой причине более перспективным является создание покрытий с иммобилизованными ферментами. Другим недостатком является высокая стоимость по сравнению с традиционным лечением антибиотиками.

**Альгинатлиазы** хорошо зарекомендовали себя против биопленок, образуемых *P. aeruginosa* (Alkawash et al., 2006). Следует отметить работу сотрудников Института Гамалеи (Степанова et al., 2010) о влиянии альгинатлиазы и сепацианлиазы в сочетании с ципрофлоксацином пороговой концентрации как на формирующиеся *in vitro*, так и на уже сформированные биопленки *P. aeruginosa* и *B. cepacia* соответственно. В первом случае антибиотик и фермент добавляли одновременно с культурой, во втором – спустя непродолжительное время. Для продукции ферментов, расщепляющих полисахариды, использовали 8 выделенных из природных источников штаммов *Bacillus* различных видов. Против синегнойной палочки использовали альгинатлиазу, против *B. cepacia* – сепацианлиазу. Показано, что количество биопленок заметно снижается при сочетании антиполисахаридного и антибактериального агента, в то время как без добавления фермента

картина меняется не столь сильно. При микроскопировании окрашенных альциановым синим препаратов контрольные образцы выглядят как плотные образования, в то время как обработанные лиазами представляют собой рыхлые паутинообразные структуры. Авторы сделали вывод, что разрушение экзополисахаридного матрикса повышает доступность клеток для антибиотика. Против биопленок, образуемых стафилококками, можно использовать дисперсин В (гликозид-гидролазу, катализирующую гидролиз главного матриксного полисахарида поли-N-ацетилглюкозамина). Этот фермент продолжает привлекать внимание исследователей отчасти потому, что найден его природный продуцент – граммотрицательный патоген полости рта *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kaplan et al., 2003). В одной из работ (Donelli et al., 2007) изучали ингибиторное влияние очищенной  $\beta$ -N ацетилглюкозаминидазы на биопленки *S. epidermidis* как в сочетании с антибиотиком цефалоспорином, так и без него, а также проверили эффективности адсорбции дисперсина В и антибиотика на различных полиуретановых покрытиях (коммерческое название PELLETHANE) предложенных для получения медицинских инструментов, устойчивых к микробному обрастанию.

Другой областью применения гидролаз может служить борьба с зубными бляшками. Однако здесь существует проблема иммобилизации ферментов, так как для эффективного разрушения биопленки необходимо достаточно длительное воздействие фермента (Pleszczyńska et al., 2015). Возможным решением проблемы является длительная терапия или добавление ферментного препарата в состав жевательной резинки.

Известно, что внеклеточная ДНК является матриксным компонентом биопленок многих бактерий (Shields et al., 2013), в том числе и стафилококков (главный компонент у *S. aureus*, минорный второстепенный – у *S. epidermidis*), выполняя ряд важных функций, таких как: стабилизация трехмерной структуры матрикса, участие в инициации адгезии клеток (Nijland et al., 2010), перенос генетической информации, а также играя роль питательного субстрата. В связи с этим использование в качестве антибиопленочного агента ДНК-аз представляется возможным несмотря на то, что по мере роста биопленки устойчивость к ним повышается (Pleszczyńska et al., 2015).

Целью одной из таких работ (Kaplan et al., 2012) было изучение действия рекомбинантной человеческой ДНК-азы против биопленок ряда штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*. Количество биопленок *S. aureus* снижалось до 90% *in vitro* при концентрациях ДНК-азы от 0.125 до 4 мкг/л в зависимости от штамма. Доказана роль фермента в нарушении структуры биопленок. Обработка биопленок биоцидами (глюконат хлоргексидина, хлорид бенкзалкония, иодид повидона), после 10-минутной инкубации с ферментом, оказалась в 4-5

раз эффективней, чем без фермента. Для эксперимента *in vivo* использовали нематоду *C. elegans*, зараженную *S. aureus* КВ1-11, жизнеспособность червей оценивали по наличию движений. Другим авторам (Swantjes et al., 2013) удалось показать эффективность иммобилизованной на полиметакрилатных покрытиях ДНК-азы I. Наконец, относительно недавно опубликована работа (Humes et al., 2013), в которой сообщается об эффективности ДНК-азы против вагинальной инфекции, вызванной *Gardnerella vaginalis*.

Против биопленок эффективны ДНК-азы как эукариотного, так и прокариотного происхождения. Однако использование бактериальных ферментов дешевле. Перспективным является использование ДНК-азы NucB, выделенной из морского микроорганизма *Bacillus licheniformis* EI-34-6. Это небольшой по сравнению с другими нуклеазами фермент (12 кДа); ранее была показана (Nijland et al., 2010) его высокая эффективность против биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий даже при низких концентрациях. Бычья ДНК-аза I полностью разрушает биопленки при концентрации 15 нг/мл, в то время как бактериальная NucB – при 3 нг/мл (Nijland et al., 2010). Недавно (Shields et al., 2013) была проверена возможность использования этой нуклеазы против биопленок бактерий, выделенных из слизистой оболочки придаточных пазух носа людей, больных хроническим бактериальным синуситом. Объектом исследования служили различные штаммы стафилококков, стрептококков, коринебактерий. В большинстве случаев количество биопленок снижается при обработке NucB. Однако биопленки *S. salivarius* FH29 оказались не чувствительны к нуклеазе. Это связано с тем, что данный штамм не использует крупные фрагменты ДНК для стабилизации трехмерной структуры матрикса.

Эндогенные **протеиназы** содержатся в полимерном матриксе и нужны для дисперсии созревших биопленок. Однако применение экзогенных протеиназ может искусственно ускорить этот процесс. Сериновая протеиназа Esp, секретлируемая *S. epidermidis*, может использоваться как против предформированных, так и против зрелых биопленок золотистого стафилококка. Esp также повышает чувствительность биопленок *S. aureus* к антимикробному пептиду бета-дефензину 2 (Iwase et al., 2010). Против биопленок *S. aureus* эффективны также эластаза LasB (Park et al., 2012), полученная из *P. aeruginosa*, и протеиназа K (Park et al., 2012). Интересно, что эластаза может усиливать транскрипцию генов золотистого стафилококка, кодирующих собственные протеиназы, ускоряя, таким образом, дисперсию биопленки. Такой способностью обладают как очищенный фермент, так и супернатант культуры *P. aeruginosa*. Внеклеточная пептидаза (SPEP) – металлсодержащая протеиназа, продуцируемая *S. marcescens*, эффективна против биопленок *Listeria monocytogenes*. Это вещество уже давно используется как противоопухолевый агент (Longhi et al., 2008).



#### **1.4.2 Стимуляция дисперсии биопленки**

Одним из факторов дисперсии биопленки является NO (оксид азота II), выполняющий роль сигнальной молекулы. NO-синтаза (NOS) – ключевой фермент NO-зависимого межклеточного сигналинга у многоклеточных организмов. Основной функцией этого фермента является защита от окислительного стресса (Gusarov, Nudler, 2005). В одной из работ, на примере *B. subtilis* 3610 было показано (Schreiber et al., 2013), что ни наличие ингибиторов NOS, ни доноров NO, ни мутаций *nos* гена не влияют на образование биопленок, спорообразование и рост бактерий. Однако *nos* мутанты показали большую степень дисперсии клеток из биопленок. Это указывает на то, что NOS вовлечена в процессы поддержания стабильности биопленок; так же как это может быть связано с ролью данного фермента в переключении метаболизма при анаэробных условиях. В цитируемой работе авторы отмечают, что в этом случае дисперсия не приводит к существенному изменению структуры биопленки. Однако, за последние годы появился ряд работ, направленных на повышение эффективности NO как антибиопленочного агента (Cutruzzolà, Frankenberg-Dinkel, 2016). В частности, в одной из работ была показана эффективность химически нестабильных соединений, например, диазениумдиолатов (diazoniumdiolates) осуществляющих локальное генерирование NO в местах расположения микробных биопленок (Barraud et al., 2015). Необходимость использования таких, медленно образующих NO соединений, вероятно, объясняется свойством NO выполнять функцию индуктора дисперсии только в очень низких, не токсичных концентрациях (микро-или пиколярных). По-видимому, NO участвует в коммуникации бактерий, живущих в межвидовых биопленках. Таким образом, возникает возможность применения NOS ингибиторов для избирательной дисперсии биопленок, образованных патогенными бактериями (Rabin et al., 2015). Действительно, имеются сведения о том, что подобно вышеупомянутым лактоназам, NO также может использоваться бактериями мультивидовых сообществ с целью подавления роста биопленок-конкурентов (Rendueles, Ghigo, 2012).

Другим индуктором дисперсии может выступать цис-2 -деценвая кислота. Показана эффективность этого соединения как против моновидовых, так и бинарных биопленок *E. coli* и *K. pneumonia* (Rahmani-Badi et al., 2014) в сочетании с ципрофлоксацином и ампициллином. Это соединение регулирует активность нескольких сотен генов, ответственных за биопленочный фенотип у *P. aeruginosa* (Marques et al., 2015)

#### **1.4.3 Использование полисахаридов и гликолипидов**

На первый взгляд, такой подход может показаться парадоксальным, так как полисахариды являются преобладающим компонентом матрикса для многих биопленок.

Однако они также могут играть роль биосурфактантов. Как правило, биосурфактанты участвуют в процессе роста биопленки, но также являются и факторами дисперсии. Наиболее изученными в этом отношении биосурфактантами являются гликолипиды (рамнолипиды) и гликопептиды (Banat et al., 2014). Так, например, рамнолипиды показали противомикробную активность как в отношении бактериальных (Dusane et al., 2010), так и дрожжевых биопленок (Dusane et al., 2012). При этом монорамнолипиды обладали бактериостатическим действием, в то время как дирамнолипиды оказывали бактерицидный эффект (Diaz De Rienzo et al., 2016). Как мы отмечали в главе 1.2, противомикробный эффект рамнолипидов может быть объяснен увеличением мембранной проницаемости (Sotirova et al., 2008).

#### **1.4.4 Борьба с персистенцией в биопленках**

«Феномен персистенции (persistence), т.е. генетически ненаследуемого (фенотипического) свойства небольшой части бактериальной популяции сохранять жизнеспособность даже в присутствии летальных доз пенициллина, был открыт на заре “эры антибиотиков”» (см. обзор: Плакунов с соавт., 2010). Существенной особенностью клеток-персистеров является заниженная скорость метаболизма, а не полное его прекращение, в присутствии бактериостатических концентраций антибиотика. В случае патогенных бактерий это свойство позволяет клеткам-персистерам выживать в биопленках при антибиотикотерапии, и после прекращения действия антибиотика давать начало новой популяции, возобновляя инфекционный процесс. Несмотря на это, активно разрабатываются методы как прямого уничтожения персистеров, так и включающие в себя предварительное их «пробуждение» (Плакунов с соавт., 2017). Например, митомицин способен подавлять персистеры напрямую путем связывания с ДНК. Роль «клеточного будильника» может выполнять вышеупомянутая цис-2-деценная кислота (Marques et al., 2015), а также различные метаболиты, такие как маннит, глюкоза, пируват (Pascoe et al., 2014). Менее перспективной выглядит возможность предотвращения самого формирования клеток-персистеров. Например, путем скрининга такая способность обнаружена для ингибиторов одной из алкилхинолин-зависимой систем QS (сопряженной с PQS-системой) *P. aeruginosa* – производных бензимидазола (Starkey et al., 2014). Ранее упомянутые бромированные фураноны также обладают сходной активностью (Pan et al., 2012). Детальные сведения о персистерах обобщены в монографии (Michiels, Fauvart, 2016).

#### **1.4.5 Использование бактериофагов**

Перспективы использования бактериофагов против биопленок выглядят неоднозначными. К недостаткам данного метода можно отнести наличие матрикса, который

затрудняет доступ фаговых частиц к клеткам (Kau et al., 2011). Фаговая терапия имеет и ряд других недостатков, таких как (1) сложность подбора терапевтической дозы, (2) узкая специфичность фаговых частиц, (3) вне-, и внутриклеточные механизмы устойчивости бактерий к фагам, (4) многоэтапный процесс производства препаратов, включающий очистку от эндотоксинов, (5) возможное возникновение воспалительных реакций в организме за счет высвобождения эндотоксинов при лизисе бактериальных клеток фагом, а также (6) затруднение доставки фага к мишени иммунной системой хозяина (Labrie et al., 2010). Однако бактерии в биопленках более чувствительны к фаговой инфекции, видимо, по причине высокой плотности популяции (Abedon, 2012). Установлено (Doolittle et al., 1995), что фаг T4 существенно снижает количество биопленок *E. coli in vitro*. Показан, как и для других противобиопленочных агентов, синергидный эффект фагов в сочетании с антибиотиками (Ryan et al., 2012). Для увеличения эффективности фаговой терапии можно использовать литические ферменты фагов вместо самих вирусных частиц (Chan, Abedon, 2015).

## 1.5 Стратегии поиска модуляторов роста биопленок

### 1.5.1 Модуляторы, вырабатываемые высшими организмами

В главе 13 мы сделали краткий обзор ингибиторов бактериального «чувства кворума». Для определения QS-активности часто используют довольно простые биосенсоры. Например, *Chromobacterium violaceum* продуцирует пигмент виолацеин, синтез которого находится под контролем системы QS (Журина с соавт., 2013). Отсутствие окрашивания означает подавление продукции АГЛ, и, следовательно, ингибирование QS. Другим популярным сенсором являются штаммы *Agrobacterium tumefaciens*, кодирующие  $\beta$ -галактозидазу в присутствии экзогенных АГЛ. О наличии продукции АГЛ судят по гидролизу X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил- $\beta$ -D-галактозида) с появлением голубых зон. Можно оценивать и другие конечные продукты QS-зависимого биосинтеза, например, пиоцианин или протеолитические ферменты для псевдомонад. Активность QS-зависимых генов можно отслеживать путем конструирования самых различных репортеров. Обилие сложных молекул в природе в сочетании с наличием простых репортерных систем привели к тому, что в последние два десятилетия мы сталкиваемся буквально с лавиной публикаций, посвященных тому или иному ингибитору бактериального «чувства кворума». Нельзя не отметить очевидные плюсы такого подхода, особенно когда мы имеем дело с большим набором соединений. Однако ингибирование систем QS вовсе не означает специфического её подавления в силу сопряжения с другими метаболическими путями. К сожалению,

значительная часть работ ограничивается лишь констатацией факта ингибирования биосинтеза конечного продукта без более детальных попыток изучения механизмов.

Большое число работ посвящено скринингу и анализу экстрактов множества растений на предмет ингибиторной активности. Кроме того, антимикробные метаболиты, в том числе и ингибиторы QS, выполняют функцию иммунной системы у грибов и растений. Наличие таких вторичных метаболитов объясняется коэволюцией с бактериями и созданием многочисленных симбиозов. Протеомный анализ, проведенный на люцерне усеченной (*Medicago truncatula*), показал, что при воздействии АГЛ меняется содержание 154 белков (Gao et al., 2003). Более того, в секретах корня содержались как агонисты, так и ингибиторы системы АИ-2-зависимой системы QS.

К таковым, относится, в частности, австралийская красная макрофитная водоросль *Delisea pulchra* (Гл. 1.3.) – продуцент фуранонов.

Ранее мы упоминали о том, что ингибиторный эффект фуранонов связан не только с системой QS. Кроме того, в настоящий момент их практическое применение сомнительно из-за цитотоксичности. Эксперименты на радужной форели (Rasch et al., 2004), и на коловратках *Brachionus plicatilis* (Tihnt et al., 2007), показали, что фураноны при повышении концентрации в водных резервуарах (1 мкмоль/мл для фуранона С-30 в экспериментах с форелью и примерно 24 мкмоль/мл для фуранона С-2 в экспериментах с коловратками) приводили к внезапной гибели рыб (менее, чем за 4 ч) и значительно снижали скорость роста коловраток. В другом исследовании была обнаружена токсичность для фибробластов человека фуранона С-56 в концентрациях > 10 мкмоль/мл (Lönn-Stensrud et al., 2012), однако уровни до 20 мкмоль/мл фуранона С-30 не были токсичными для раковых клеток HeLa человека (Rasch et al., 2004). В экспериментах на мышах *in vivo*, в которых использовалось до 17 мкг/г массы тела С-56 или до 2 мкг/г массы тела С-30, явного воздействия на здоровье мышей не наблюдалось.

Ряд ингибиторов QS представлен среди вторичных метаболитов высших растений. Так, из корней хрена (*Armoracia rusticana*) выделен иберин (1-изоциано-3-метилсульфинилпропан), чья ингибиторная активность против двух регуляторных АГЛ-зависимых систем *P. aeruginosa* была подтверждена методами «ПЦР в реальном времени» и ДНК-микрочипов (Jakobsen et al., 2012). Результаты одних экспериментов, проводимых на *E. coli*, говорят в пользу того, что иберин конкурирует с коротко- и среднецепочечными производными АГЛ за сайты связывания их с регуляторными белками. Похожим веществом является аджоин (ajoene, 4,5,9-тритриододека-1,6,11-триен-9-оксид) – вещество, выделенное из чесночного

экстракта (Jakobsen et al., 2012). Оно обладает выраженным антимикробным эффектом по отношению к *Klebsiella*, *Xanthomonas*. Для исследования ингибиторного влияния на АГЛ-зависимые системы синегнойной палочки был использован синтетический аналог аджоина. Установлено, что при концентрации аджоина 80 мкг/мл количество С4-HSL снижается в три раза в планктонной культуре *P. aeruginosa*. Возможно также синергидное взаимодействие между аджоином и антибиотиком тобрамицином: совместное применение двух препаратов против биопленок приводит к гибели 90% входящих в биопленку клеток *in vitro*.

Большой интерес представляют ингибиторы QS-систем, содержащиеся в продуктах питания, в частности, в плодах съедобных тропических растений (Musthafa et al., 2010). *Ananas comosus*, *Musa paradisiaca*, *Manilkara zapota*, *Ocimum sanctum* широко используются в нетрадиционной медицине. Так, корни и плоды ананаса обладают противовоспалительным действием, молодые плоды *M. zapota* (саподилла, масляное дерево) используют для лечения диареи. Обнаружено, что водные экстракты вышеперечисленных растений способны снижать АГЛ-зависимую продукцию виолацеина у *Chromobacterium violaceum* ATCC, CV026 и *P. aeruginosa* PAO1. Было показано (Huerta et al., 2008, цит. по Musthafa et al., 2010; Musthafa et al., 2010), что полученные экстракты могут снижать общую ферментативную активность у бактерий, в частности, протеолитическую. Предполагается, что экспрессия у штамма PAO1 *P. aeruginosa* протеиназ LasA и LasB, играющих большую роль в патогенезе и деградации тканей хозяина, находится под контролем АГЛ. Также было показано, что исследуемые растения, за исключением *O. sanctum*, способны существенно снижать количество биопленок, что согласуется с более ранними аналогичными опытами, проведенными на неочищенных экстрактах других растений (Adonizio et al., 2008, цит. по Musthafa et al., 2010). В то же время никакого их влияния (при низкой концентрации) на рост и жизнеспособность планктонных клеток не наблюдалось. Такого рода исследования заставляют искать подходы к выделению ингибиторов в чистом виде и их искусственному синтезу. В то же время необходим постоянный скрининг все новых растений на предмет QS-ингибиторной активности, особенно в связи с недавно выявленной цитотоксичностью фуранонов (см. выше). В этом случае интерес представляет, например, циннамальдегид (коричный альдегид), широко используемый для приготовления напитков, продуктов питания, жевательной резинки, в парфюмерной и пищевой промышленности. Результаты экспериментов (Brackman et al., 2008) говорят о том, что коричный альдегид не влияет на рост бактерий и систему биолюминесценции. В качестве доказательства последнего плазмиды, содержащая *lux*-гены с *lacZ*-промотором была интегрирована в клетки штамма *E. coli* с дефектной АИ-2 системой. Биолюминесценция в этом случае не ингибировалась.

Предполагается (Brackman et al., 2008), что циннамальдегид нарушает связь транскрипционного фактора LuxR с промотором, тем самым блокируя экспрессию соответствующих генов. Однако причина этого не ясна до сих пор. Возможно, понять механизм поможет тот факт, что коричный альдегид способен ковалентно взаимодействовать с цистеиновыми остатками некоторых белков (Macpherson et al., 2007).

Существуют немногочисленные данные о взаимодействии антибиотиков с системами биосинтеза факторов quorum sensing (ацилгомосеринлактонов). Механизмы такого влияния детально не изучены и могут отличаться у разных микроорганизмов. Так, одни авторы показали, что субингибиторные концентрации тобрамицина подавляют N-ацетилгомосеринлактон-зависимую систему у штамма PUPa3 *P. aeruginosa*, приводя к снижению биопленкообразования (Babić et al., 2010). Однако, по данным других исследователей, тобрамицин в субингибиторных концентрациях усиливает образование биопленок штаммом *P. aeruginosa* PAO1 (Linares et al., 2006). Хотя для вышеуказанного штамма наблюдалось подавление N-ацетилгомосеринлактоновой quorum sensing системы в присутствии трех других антибиотиков (фторхинолона, цефалоспорины, азитромицина, (Skindersoe et al., 2008).

Другим природным источником модуляторов роста биопленок могут являться антимикробные пептиды, образуемые широким кругом организмов, от прокариот до высших эукариот, в том числе и человека (Плакунов с соавт., 2017). Например, *Lactobacillus reuterii*, входящий в состав нормальной микробиоты влагалища человека, продуцирует циклические дипептиды, ингибирующие Agg-зависимую систему стафилококков, подавляя таким образом экспрессию токсина синдрома токсического шока (TSST). К настоящему времени изолировано или предсказано с помощью компьютерного поиска около 1000 таких пептидов. Их активность проявляется против формирующихся, а также (в меньшей степени) против зрелых биопленок грамположительных бактерий (в том числе против многих возбудителей тяжелых инфекций) (Плакунов с соавт., 2017). Циклические дипептиды (дикетопиперазины, ДКП) продуцируются многими другими видами бактерий и способны вмешиваться (как стимулировать, так и ингибировать) пути передачи сигналов АГЛ. Возможно новое направление в поиске таких пептидов откроется после более детального изучения взаимодействия конкурентных микроорганизмов: Например, пептидная система QS у патогена ротовой полости *Str. mutans* ингибируется в смешанной биопленке с конкурентными видами (Tamura et al., 2009), хотя сами ингибиторы не были идентифицированы.

Не меньший интерес представляет влияние гормонов человека на его микробиоту. Так, вещество Р (нейропептид) способно усиливать адгезию и вирулентность кожных бактерий (N'Diaye et al., 2017). Ряд эндогенных пептидов человека, например, дефензины и кателицидины, являются защитными агентами и обладают антимикробным эффектом. В наибольшей степени исследовано взаимовлияние микробиома кишечника и различных гуморальных факторов, нейрогормонов и других (Олескин с соавт., 2016). Это позволяет, с одной стороны, рассматривать подобные антимикробные соединения как перспективную альтернативу или дополнение традиционным биоцидам и антибиотикам. С другой стороны, к таким соединениям прямого антимикробного действия микроорганизмы могут развивать устойчивость, подобную устойчивости к антибиотикам (Miller et al., 1990; Mount et al., 2014; Sakoulas et al., 2014), что делает необходимым вести поиск новых антимикробных и регулирующих микробиоту препаратов и среди соединений, напрямую не представляющих из себя антимикробные вещества. Это, в первую очередь, гормоны, которые циркулируют по кровотоку и могут вступать в контакт с микробиотой человека, такие как, к примеру, катехоламины и натрийуретические пептиды (Gannesen et al., 2018). Интерес представляет и пробиопленочное действие гормонов человека, таких как норэпинефрин или допамин (Lute et al., 2003)

### ***1.5.2 Стратегия «перенацеливания лекарств»***

В англоязычной литературе данная стратегия обозначается термином «drug rerouting», который мы приводим в условном переводе в заголовке главы. Речь идет о применении в качестве модуляторов роста биопленок веществ, широко используемых в клинической практике, косметике и т.д. Преимущества данного подхода состоят в (1) возможности предсказания эффекта *in vivo*, (2) в том, что отлажен процесс синтеза препарата и, наконец, (3), в том, что препарат широко используется, и, как правило, не токсичен в терапевтических дозах. Данный подход в настоящее время представляется нам куда более перспективным, чем использование природных соединений, хотя в ряде случаев (например, растительных экстрактов) граница между ними весьма условная. Кроме того, с его помощью можно обнаружить антибиопленочную активность как широко применяемых антибиотиков и других биоцидов, так и веществ, совсем не применяемых в антимикробной терапии, например, антидепрессантов (Caldara, Marmioli, 2018). Данную стратегию используют при поиске противораковых, антибактериальных соединений, с активным участием компьютерного моделирования. Как мы отмечали ранее, при поиске новых ингибиторов биосинтеза сигнальных молекул QS часто упускается тот факт, что они могут влиять и на другие метаболические пути. По этой причине возможно развитие устойчивости даже к

специфическим ингибиторам QS по тем же принципам, как и для антибиотиков (Kalia et al., 2014), в частности, путем модификации или активного транспорта из клетки. Кроме того, оценка активности систем QS по конечным продуктам биосинтеза часто весьма проста, эксперименты с биосенсорами занимают считанные дни. Именно по этим причинам в последние десятилетия мы имеем дело с огромной массой статей, посвященных «противоковорумным» свойствам того или иного растительного экстракта.

Существенно облегчают внедрение этого подхода и наличие коммерческих библиотек соединений, а также полуавтоматическое оборудование для такого анализа. Например, Prestwick Chemical Library содержит 1280 соединений, одобренных FDA, (Federal Drug Administration, Управление контроля пищевых продуктов и медикаментов США). Рост биопленок, как правило, оценивают по классической методике выращивания в 96-луночных планшетах с последующим окрашиванием. (O'Toole, 2011). Немало работ посвящено скринингу библиотек на предмет активности против патогенных грибов, в частности, возбудителя криптококкоза человека *Cryptococcus neoformans* (Joffe et al., 2017) и *Candida albicans* (Siles et al., 2013). Недавно была опубликована работа (Torres et al., 2016), в которой приведены результаты скрининга такой библиотеки на *S. aureus*, устойчивом к метициллину (MRSA). Авторам удалось показать противобиопленочную активность ряда противогельминтных (никлозамид, памоат пирвиния, ивермектин), противоопухолевых (кармофур, гидрохлорид эпирубицина), и еще нескольких соединений смешанного типа действия, среди которых самым эффективным оказался золотосодержащий иммуносупрессор ауранофин. Для последнего в ряде других работ показан как антимикотический (Thangamani et al., 2017; Wiederhold et al., 2017), так и противобактериальный эффект в отношении стрептококковых (Díez-Martínez et al., 2016) и кожных стафилококковых инфекций (Thangamani et al., 2017). Недавно был обнаружен его синергидный эффект с колицином в отношении предформированных биопленок *P. aeruginosa*, хотя по отдельности эти соединения являются слабыми ингибиторами (Torres et al., 2018).

Похожая работа посвящена скринингу библиотеки Selleck, содержащей 853 соединения (Saputo et al., 2018), и проведена на патогене ротовой полости *Str. mutans*. Авторы использовали метод измерения аденилаткиназной активности для измерения бактерицидной активности соединений. Таким способом удалось выявить 126 активных в отношении биопленок препаратов, около половины из которых относилась к стандартным, широко используемым противомикробным агентам. Помимо этого, удалось также выявить активность ряда ионных хелаторов против биопленок, а также нескольких противоопухолевых соединений.



Открытие новых модуляторов роста биопленок среди уже известных требует массового скрининга. Например, одним из таких соединений, получивших «новую жизнь» в качестве противобиопленочного агента, является 5-фторурацил (5-ФУ), полученный в 1957 г (Heidelberger et al., 1957). Спустя двадцать лет клинические испытания подтвердили, что 5-ФУ является эффективным противораковым препаратом. На сегодняшний день 5-ФУ широко используется в клинической практике как при основной, так и вспомогательной химиотерапии различных видов рака. В 1985 г были открыты его противомикробные свойства (Gieringer et al., 1986) в отношении стафилококков, а также грамотрицательных бактерий в сочетании с бета-лактамами антибиотиками. Показана противобиопленочная активность 5-ФУ в отношении *P. aeruginosa* энтерогеморрагических штаммов *E. coli* (Attila et al., 2009), подтверждена она и в цитированных выше работах Torres с коллегами. Было проведено исследование на людях, показавшее эффективность 5-ФУ в иммобилизованном виде на поверхности катетеров (Walz et al., 2010). Механизм действия 5-ФУ остается пока неясным. Поскольку биосинтез урацила играет важную роль в работе систем QS, биосинтезе факторов вирулентности и образования биопленок (Ueda et al., 2009), противобиопленочный эффект 5-ФУ объясняется вмешательством в этот процесс. Возможность более широкого применения 5-ФУ покажут дальнейшие исследования, тем более что следует быть весьма осторожным в свете его возможной кардиотоксичности (данные обобщены в обзоре (D Sara et al., 2018)).

Отдельно следует упомянуть противогельминтный препарат – никлозамид, как наглядный пример удачного «перенацеливания». В последние годы появился ряд статей (Sack et al., 2011; Pan et al., 2012; Stewart et al., 2016) о его противораковой активности. Причиной тому может являться возможность ингибирования никлозамидом большого числа сигнальных путей в эукариотических клетках. В 2013 г была опубликована статья, в которой сообщалось о противокворумной активности никлозамида (Imperi et al., 2013) в отношении *P. aeruginosa*. Однако дальнейшие исследования, проведенные при участии диссертанта (см. главу 3. 1) показали, что в отношении грамположительных бактерий, наряду с противобиопленочной активностью, никлозамид демонстрирует также и выраженную антибактериальную активность против планктонных культур (Журина и соавт., 2017). Заметная противобактериальная активность никлозамида позволяет создавать противомикробные покрытия для имплантатов на его основе (Gwisai et al., 2018).

## 1.6 Стимуляторы роста микробных биопленок

### 1.6.1 Антибиотики как индукторы роста биопленок

Ряд исследований (Hoffman et al., 2005; Зайцева с соавт., 2011; Стрелкова с соавт., 2012) свидетельствует о стимулировании субингибиторными концентрациями антибиотиков образования биопленок у сапротрофных и патогенных микроорганизмов. Наряду с наличием клеток-персистеров, данный феномен лежит в основе устойчивости биопленочных микроорганизмов к антибиотикам. В конце первого десятилетия XXI века сделаны первые попытки установить молекулярные механизмы этого феномена. В настоящий момент можно предложить несколько объяснений данному явлению.

Первое объяснение состоит в том, что продукты лизиса клеток при воздействии антибиотика сами же служат строительным материалом для внеклеточного матрикса. Таковым может служить, в частности, внеклеточная ДНК. По причине гетерогенности популяции часть клеток гибнет даже при воздействии антибиотика в субингибиторной концентрации; кроме того, в ряде случаев можно наблюдать программируемый лизис клеток. Так, в популяции *P. aeruginosa* происходит лавинообразный лизис клеток, который усиливается при воздействии митомицина и ципрофлоксацина. Процесс лизиса связан с экспрессией профага, содержащего генные кластеры R-, и F-типа, кодирующие белок Lys (эндолизин). Митомицин и ципрофлоксацин, связываясь с ДНК, вызывают RecA-опосредованный SOS-ответ, который индуцирует экспрессию профага в клетке (Turnbull et al., 2016). Однако использование продуктов лизиса в качестве пищевых веществ не может объяснить многократной стимуляции роста биопленок в присутствии некоторых антибиотиков.

Вторая причина стимуляции роста биопленок состоит в воздействии на регуляторные пути, в частности связанные со специфическим стрессовым ответом. Например, при ингибировании трансляции у *E. coli* изменяется внутриклеточная концентрация ц-ди-ГМФ и гуанозинтетрафосфата, что приводит к индукции синтеза адгезина (поли-бета-1,6-N-ацетилглюкозамина). (Boehm et al., 2009). Сходные данные были получены для *P. aeruginosa*: ингибитор трансляции аминокликозидный антибиотик тобрамицин стимулирует рост биопленок в концентрациях ниже МИК, в то время как другие антибиотики: полимиксин В, хлорамфеникол и карбенициллин, не оказывали такого влияния (Hoffman et al., 2005). Авторы пришли к выводу, что стимуляция является в данном случае специфическим ответом на аминокликозиды, и сделали попытку подробнее изучить её механизм. Оказалось, что эффект отсутствует у мутантов с дефектным геном фосфодиэстеразы *arr*. Эти результаты противоречат известным данным о том, что высокий уровень внутриклеточного ц-ди-ГМФ

необходим для стабильного созревания биопленки, поскольку Агг катализирует деградацию ц-ди-ГМФ в клетке. Такой необычный эффект можно объяснить наличием других дигуанилатциклаз и фосфодиэстераз. Примечательно, что стимуляция роста биопленки тобрамицином имеет место у некоторых клинических изолятов с полностью отсутствующим геном *arr*, что может говорить и о других механизмах, лежащих в основе данного эффекта. Помимо аминоклизинов, стимулирующий эффект оказывает также  $\beta$ -лактамный антибиотик имипенем (Bagge et al., 2004). Во всех случаях стимуляция роста биопленок *P. aeruginosa* антибиотиками связана с повышенной секрецией полисахаридных компонентов ВПМ (Kaplan, 2011; Ганнесен с соавт., 2015; Мартьянов с соавт., 2015). Стимуляция синтеза компонентов ВПМ показана и для других микроорганизмов, в частности полисахаридов для *Haemophilus influenza* (Kaplan et al., 2012; Wu et al., 2014) и внеклеточной ДНК для *S. aureus* (Mlynek et al., 2016). Антибиотик может стимулировать не только пути биосинтеза матрикса. Установлено (Nucleo et al., 2009), что субингибиторные концентрации имипенема, стимулирующие рост биопленок *Acinetobacter baumannii* на поверхности полистирола, повышают также продукцию белков, отвечающих за усвоение железа (в частности, TonB-подобного сидерофора). Такие белки играют ключевую роль в образовании биопленок и у других микроорганизмов (Lin et al., 2012).

Также имеются свидетельства, что субингибиторные концентрации антибиотиков могут усиливать адгезию клеток к поверхности. В частности, фторхинолоновый антибиотик норфлоксацин в субингибиторных концентрациях также способен облегчать взаимодействие клеток *S. aureus* и *P. aeruginosa* с поверхностью (Kumar, Ting, 2013). В последующей работе те же авторы показали, что стрептомицин в субингибиторных концентрациях снижает поверхностный заряд клетки и увеличивает гидрофобность клеточной поверхности (Kumar, Ting, 2016) *S. aureus* и *P. aeruginosa*. В том же исследовании показано увеличение продукции адгезина для *S. aureus*. Однако авторы отмечают также повышенный уровень гистидинкиназы ArlS, участвующей в формировании биопленок *S. aureus*. Возможно, в данном случае антибиотик воздействует на регуляторные пути. Тем не менее, данный эффект характерен лишь для некоторых антибиотиков. Так, например, уже упомянутый полимиксин В способен нарушать сборку жгутиковой фибриллы для *V. cholerae*, не оказывая влияния на экспрессию соответствующих генов. Поскольку для *Vibrio* жгутики играют важную роль на начальных этапах адгезии, полимиксин В в субингибиторных концентрациях выступает в качестве антибиопленочного агента (Giacomucci et al., 2019).

С учетом опасности стимуляции роста биопленок при терапии антибиотиками, интерес представляет поиск дополнительных агентов, снимающих стимулирующий эффект. Нами

показано, что бактериальный автоиндуктор 4-гексилрезорцин, используемый в пищевой промышленности в качестве консерванта, способен снимать стимулирующий эффект субингибиторных концентраций азитромицина, а также сам по себе обладает противобиопленочным действием в отношении ряда бактерий (Мартьянов с соавт., 2014).

### **1.6.2 Другие стимуляторы роста биопленок**

Сведения о других стимуляторах роста биопленок в настоящее время достаточно фрагментарны. В основном они относятся к регуляторным соединениям растительного и животного происхождения. Например, ряд летучих фенолов растительного происхождения способен стимулировать рост биопленок *P. aeruginosa* в 2-3 раза в субингибиторных концентрациях (Плюта, 2014).

Гораздо большее количество работ посвящено влиянию человеческих гормонов на биопленки условно-патогенных микроорганизмов. Ранее мы упоминали АИ-3-зависимую систему QS, для которой сигнальными молекулам могут служить гормоны эпинефрин и норэпинефрин. Последний обладает особенно выраженным стимулирующим эффектом на рост биопленок сальмонелл (Hiller et al., 2019). Адреналин (эпинефрин) способен также оказывать стимулирующее влияние на биопленки кожного комменсала *Micrococcus luteus* C01 *in vitro* (Данилова с соавт., 2020). Растет число работ, посвященных анти-, и пробиопленочному эффекту уже упомянутых выше пептидных гормонов. Показано, в частности, влияние динорфинов на PQS-зависимую систему чувства кворума у *P. aeruginosa*, хотя точно мишень в клетке пока не установлена. Данные о влиянии пептидных гормонов на микробные биопленки обобщены в недавнем обзоре (Lesouhaitier et al., 2019).

Отдельно следует выделить стимуляцию роста биопленок как реакцию на стрессовые физико-химические факторы окружающей среды, в частности, окислительный стресс. Об этом свидетельствует, например, стимулирующее влияние пероксида водорода на биопленки (Plyuta et al., 2015). Образование биопленки служит способом защиты от избытка атмосферного кислорода; регуляторные пути, ответственные за формирование биопленок и защиту от активных форм кислорода, частично перекрываются (Gambino, Cappitelli, 2016). Примечательно, что такой стресс может быть индуцирован и антибиотиками (Dwyer et al., 2014). Механический стресс также способен индуцировать рост микробных биопленок. В одном из недавних исследований (Chu et al., 2018) показан стимулирующий эффект избыточного давления на биопленки уропатогенных штаммов *E. coli*. Авторы использовали модифицированные каналы для микрофлюидики толщиной 6 мкм, и выращивали в них клетки при статичных условиях. Удалось продемонстрировать ускоренный переход

клеточных микроколоний к биопленочному фенотипу при повышении давления на эластичную стенку канала.

Стимуляция биопленок как специфическими агентами, так и неспецифическим стрессовыми факторами может найти перспективное применение в биотехнологии, например, для очистки сточных вод (Ножевникова с соавт., 2015). Показано, что избыток хлорида натрия стимулирует рост биопленок ацетогена *Clostridium ljungdahli* в 20 раз, что может найти применение для биотехнологического производства синтез-газа (Philips et al., 2017).

### **1.6.3 Расширенное понятие о модуляторах роста биопленок**

Приведенный нами обзор показывает, что наличие разветвленных метаболических путей, ответственных за формирование биопленок, делает невозможным подбор универсального модулятора, не затрагивающего другие процессы в клетке. Наиболее перспективной стратегией поиска, на наш взгляд, является «стратегия перенацеливания», так как предполагает меньше затрат на клинические испытания уже проверенных на практике соединений, пусть и в новом качестве. Малоизученным является стимуляция роста биопленок и систем QS, хотя в перспективе эта стратегия имеет важное значение для биотехнологии (Ножевникова с соавт., 2015). Помимо антибиотиков в субингибиторных концентрациях, рост биопленок может стимулироваться другими стрессовыми факторами, например, пероксидом водорода (Plyuta et al., 2015). Уже упомянутый нами QS-зависимый синтез виолацеина хромобактерий может быть стимулирован органическим растворителем диметилсульфоксидом (Chaudhari et al., 2014; Мартынов с соавт., 2018). Последняя работа проведена диссертантом (см. Глава 3, 2).

Огромный фактический материал и методологическая база, накопленные к настоящему моменту, требуют, во-первых, скоординированных усилий отдельных лабораторий и научных центров для стандартизации методов скрининга и разработки новых модуляторов роста биопленок, а во-вторых, большой теоретической работы по осмыслению накопленного материала. С нашей точки зрения подлинный ренессанс науки о биопленках лишь предстоит в будущем. Мы выражаем надежду, что настоящая работа и, в частности, данный анализ литературы помогут получить общее представление о молодой науке «биофильмологии», и внесут определенный вклад в её развитие.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

Объектами исследования служили модельные сапротрофные микроорганизмы, взятые из лабораторной коллекции, а также из коллекции Department of Systems and Synthetic Microbiology, Max Plank Institute, Германия; Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, и лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов, ИМГ РАН. Критериями для подбора модельных объектов служили: (1) способность образовывать детектируемые биопленки, (2) возможно полная фенотипическая близость к патогенным микроорганизмам. Описание модельных микроорганизмов представлено в табл.1.

**Таблица 1** — Модельные штаммы, используемые в работе.

Название штамма	Краткая характеристика	Источник
1	2	3
<i>Kocuria rhizophila</i> DC2201	Аэробные грамположительные кокки Метаболизируют углеводороды	Коллекция лаборатории нефтяной микробиологии ИНМИ им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.
<i>Dietzia natronolimnaea</i> 2610-1	Аэробные грамположительные палочки. Метаболизируют углеводороды.	Выделен из пластовых вод Ромашкинского нефтяного месторождения
<i>Rhodococcus equi</i>	Грамположительные кокки. Образуют агрегаты в среде	Ромашкинского нефтяного месторождения
<i>Kytococcus schroeteri</i> H01	Грамположительные аэробные кокки. Колонии белесого цвета. Образуют тетрады и скопления. Симбионты человека.	Коллекция лаборатории нефтяной микробиологии ИНМИ им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН. Выделен с кожи здорового добровольца

Продолжение Таблицы 1.

1	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i> MFP03	Грамположительные неподвижные факультативно аэробные кокки. Симбионты человека.	Коллекция laboratoire de signaux microbiologie et microenvironnement EA 4312, Evreux, France. Выделен с кожи человека
<i>S. aureus</i> 209P	Грамположительные факультативно анаэробные кокки. Лабораторный штамм.	Коллекция лаборатории нефтяной микробиологии ИНМИ им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.
<i>Micrococcus luteus</i> C01	Грамположительные аэробные кокки. Колонии ярко-желтого цвета. Образует тетрады. Симбионты человека	Коллекция лаборатории нефтяной микробиологии ИНМИ им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН. Выделен с кожи здорового добровольца
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV WT	Грамотрицательные подвижные палочки. Колонии белесые, со возрастом окрашиваются в сиреневый цвет пигментом виолацеином.	Коллекция ИМГ РАН. Любезно предоставлен д.б.н., проф. И.А. Хмель
<i>C. violaceum</i> CV026	Smr mini-Tn5 Hgr <i>evil::Tn5xylE</i> Kmr. Образует виолацеин только при наличии в среде экзогенных АГЛ	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Грамотрицательные подвижные палочки. Образует пигмент пиоцианин желто-зеленого цвета.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 6863	<i>P. aeruginosa</i> PAO1, несет плазмиду pME6863, содержащую клонированный ген <i>aiiA</i> , Tcr	

Продолжение Таблицы 1.

1	2	3
<i>P. chlororaphis</i> 66	Грамотрицательные подвижные палочки. Выделен из почвы.	Коллекция ИМГ РАН. Любезно предоставлен д.б.н., проф. И.А. Хмель
<i>P. chlororaphis</i> 449	Грамотрицательные подвижные палочки. Выделен из ризосферы кукурузы. Образует пигменты феназины оранжевого цвета.	
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110 RpoS+ pVM42	Грамотрицательные подвижные палочки. Вариант с работающим геном <i>rpoS</i> . Содержит вектор pVM42 (клонированный ген <i>gfp</i> в векторе pTrc99a. Amp <sup>r</sup>	Коллекция пре, Германия. Любезно предоставлен PhD Леонидом Лаганенко (Leamid Laganenka).
<i>E. coli</i> K12 W3110	Грамотрицательные факультативно-анаэробные палочки.	
<i>E. coli</i> K12 W3110/pVS1621	<i>PcsgA-egfp</i> - в pTrc99A, Km <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup>	Данная работа
<i>E. coli</i> K12 W3110/pVS1157	<i>PfliC-egfp</i> - в pTrc99A, Km <sup>r</sup>	
<i>E. coli</i> EcoR-50	Клинический уропатогенный изолят	Коллекция Department of Systems and Synthetic Microbiology, MPI, Германия. Любезно предоставлен PhD Леонидом Лаганенко (Leamid Laganenka)..
<i>E. coli</i> DSMZ 10650	Клинический уропатогенный изолят	

## 2.2 Методы хранения и культивирования

Микроорганизмы из коллекции нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН хранили на полужидкой среде LB (0.3 % агара) в столбиках под стерильным вазелиновым маслом при 4-6<sup>0</sup>С кроме культур *Chromobacterium*, которые хранили при комнатной температуре (мутант CV026 в присутствии 100 мкг/мл канамицина). Штаммы *E. coli* хранили в жидкой среде LB (Difco), содержащей 20% глицерина и, при необходимости, антибиотик (100 мкг/мл



канамицина или 50 мкг/мл ампициллина) при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для приготовления инокулята бактерии выращивали на среде LB при  $30^{\circ}\text{C}$  на качалке (150-250 об/мин) в течение 20-24 ч. Медленно растущие культуры *D. natronolimnaea* и *R. equi* инкубировали 36-48 ч.

## 2.3 Используемые модуляторы роста биопленок

### 2.3.1 Антибиопленочные агенты

**4-гексилрезорцин.** Представитель класса алкилоксибензолов (АОБ), служащих регуляторными бактериальными аутоиндукторами, ответственными за регуляцию множества процессов в клетке (Николаев с соавт., 2006). Используется в качестве пищевого консерванта E586. В недавнем исследовании (Nikolaev et al., 2020) показан синергидный антибактериальный эффект данного соединения как в экспериментах *in vitro*, так и в опытах *in vivo* на мышах. Особенно примечательна показанная авторами высокая активность 4-гексилрезорцина против клеток-персистеров.

Для приготовления стокового раствора сухую навеску 4-гексилрезорцина (Sigma) (50 мг/мл) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) из расчета 50 мкг/мл, и разводили жидкой средой LB.

**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). Этот эффект достигается за счет того, что никлозамид является ингибитором множества сигнальных путей, а также способен воздействовать на митохондрии, индуцируя апоптоз раковых клеток (Moskaleva et al., 2015).

В работе использовали сухое вещество (НПП “Экохимтех”, Sigma). Для работы готовили стоковый раствор (5 мг/мл) в диметилсульфоксиде и разводили жидкой средой LB.

**Prestwick Chemical Library.** Библиотека препаратов, включающая 1280 соединений (Prestwick Chemical), одобренных FDA, различного спектра действия. Содержит по 100 мкл каждого соединения в виде раствора ДМСО в концентрации 10 ммоль/мл в лунках 96-ячеичного планшета. Библиотеку хранили при  $-16^{\circ}\text{C}$ . Для работы каждое соединение разбавляли в 10 раз при помощи электронной робототизированной 96-канальной пипетки (Integra VIAFLO 96/384) в ДМСО.

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

### **2.3.3 Пробиопленочные агенты**

**Азитромицин.** Макролидный антибиотик широкого спектра действия. Ингибитор белкового синтеза за счет связи с 50S рибосомой. Применяется для терапии антибиопленочных инфекций. В настоящей работе предметом изучения являлся пробиопленочный эффект, вызванный субингибиторными концентрациями азитромицина, а также антибиопленочный эффект при высоких концентрациях этого антибиотика.

**ДМСО.** Является органическим растворителем широкого применения. Используется также в косметике. В настоящей работе ДМСО (99.99%, АО «ЭКОС-1», Россия; ООО «Паритекс», Россия) обнаружена его способность как индуктора синтеза виолацеина в биопленках хромобактерий.

## **2.4 Методы получения и количественной оценки биопленок**

### **2.4.1 Получение биопленок на тефлоновых кубиках**

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). В этом случае для формирования биопленок в пробирки с 3 мл среды LB помещали 3 г тефлоновых кубиков (размер 4x4x4 мм), и после стерилизации при 1 ати вносили инокулят (обычно 50 мкл). На тефлоновых кубиках происходило формирование биопленок, планктонные (суспензионные) культуры развивались в той же пробирке в жидкой среде. После завершения инкубации планктонную культуру отделяли, и ее рост измеряли по величине условной оптической плотности (светопоглощение+светорассеяние) при 540 нм. Кубики отмывали от планктонных клеток водопроводной водой, и биопленки фиксировали 96% этанолом. После удаления спирта окрашивание биопленок производили 0.1% водным раствором красителя кристаллического фиолетового (КФ). Для окрашивания матрикса биопленок использовали краситель 1,9-диметилметиленовый синий (1,9-dimethylmethylene blue, DMMB) по модифицированной нами 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 DMMB 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 DMMB).

#### ***2.4.2 Получение и оценка метаболической активности клеток биопленок на фильтрах из стекловолокна***

Бумагу из стекловолокна (GF/F, Whatman) нарезали на квадраты размером  $2 \times 2$  см, стерилизовали их при 1 ати и стерильно накладывали на поверхность плотной питательной среды в чашках Петри. В контрольные чашки вносили соответствующее количество растворителя для испытуемых веществ. На каждый фильтр наносили по 50 мкл суточной культуры исследуемого микроорганизма. В случае подвижных бактерий инокулят иммобилизовали в 0.3% агаризованной питательной среде.

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. После инкубации фильтры с биопленками помещали в 0.1% раствор МТТ в стерильной среде LB и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Далее отмывали фильтр дистиллированной водой, и экстрагировали связанный формазан ДМСО в течение суток. Оптическую плотность экстракта измеряли при  $\lambda=590$  нм.

#### ***2.4.3 Оценка продукции виолацеина в биопленках хромобактерий***

Биопленки выращивали на фильтрах из стекловолокна как описано выше. После инкубации фильтры ополаскивали в водопроводной воде 10 с, подсушивали на фильтровальной бумаге, а затем экстрагировали виолацеин диметилсульфоксидом в течение суток. Оптическую плотность экстракта измеряли при  $\lambda=590$  нм.

В качестве альтернативы биопленки хромобактерий выращивали в 24-луночных планшетах. Для этого в каждую лунку планшета (TPP Techno Plastic Products AG) добавляли 2 мл суточной культуры, разведенной в свежей среде LB (ОП 0.1). Планшеты инкубировали 48 ч в стационарных условиях, после чего планктонные культуры удаляли, а биопленки соскребали со стенок лунки, диспергировали пипетированием, и осаждали при помощи центрифуги MiniSpin (“Eppendorf”) 5 мин при 6000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл ДМСО в течение 30 с помощью смесителя Vortex-ZX3. Спустя 15

мин смесь снова центрифугировали 5 мин при 13400 об/мин, после чего измеряли оптическую плотность супернатанта при 590 нм.

#### **2.4.4 Получение биопленок на иммунологических планшетах**

В каждую лунку с предварительно внесенным препаратом вносили 300 мкл разбавленной суточной культуры (ОП=0.1). Планшет инкубировали 20-24 ч при необходимой температуре, затем измеряли оптическую плотность суспензии в лунках на анализаторе TECAN 200 PRO. Затем удаляли планктонную культуру и дважды отмывали лунки однократным фосфатным буфером (рН 7.4) от остатков планктонной культуры, после чего фиксировали биопленки 96 % этанолом в течение 20 минут. После удаления этанола планшеты высушивали 40 мин в вытяжном шкафу, после чего биопленки окрашивали КФ (300 мкл на лунку). Спустя 20 мин несвязанный с биопленками краситель удаляли, планшеты промывали 3 раза фосфатным буфером, и экстрагировали связанный с биопленками краситель 96 % этанолом. Через 30 мин измеряли оптическую плотность экстракта на анализаторе TECAN 200 PRO.

#### **2.4.5 Конфокальная микроскопия биопленок**

Биопленки получали в 8-луночных планшетах как описано выше. Конфокальную микроскопию проводили при помощи инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss Axio Observer с использованием аргонового лазера (514 нм). В работе использовали иммерсионный объектив 63x (C-APPOCHROMAT). Визуализацию и обработку изображений проводили при помощи программного пакета Zeiss ZEN.

#### **2.4.6 Проточная цитометрия биопленочных клеток *E. coli* W3110**

В 8-луночные пластиковые планшеты (ibidi GmbH) без покрытий добавляли 400 мкл разведенной суточной суспензии *E. coli* W3110 (ОП=0.05) в среде ТВ с канамицином (50 мкг/мл). Планшеты инкубировали 20 ч при 30 °С. По завершении инкубации планктонную культуру аккуратно удаляли, а биопленку диспергировали в 400 мкл фосфатного буфера. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин при 4500 об/мин, осадок ресуспендировали в течение 1 мин на вортексе для разрушения всех межклеточных агрегатов. Суспензию разводили фосфатным буфером в 20 раз, после чего проводили измерение на проточном цитофлуориметре BD LSRFortessa SORP.

#### **2.4.7 Оценка антикворумной активности с использованием биосенсора *S. violaceum* CV026**

Метод основан на способности штамма CV026 образовывать синий пигмент виолацеин при наличии экзогенных АГЛ в среде. В чашки Петри диаметром 10 см с плотной застывшей агаризованной средой LB добавляли 10 мл полужидкой средой 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). Перед разведением культурой полужидкий агар охлаждали до 30<sup>0</sup>С, затем тщательно перемешивали пипетированием и добавляли водный раствор N-гексаноил-гомосеринлактона (С6-ГЛ) до конечной концентрации 0.1 мкг/мл. После застывания вырезали сквозные лунки в толще агара прокаленным в пламени горелки пробочным сверлом диаметром 5 мм. В лунки наносили по 100 мкл исследуемого раствора. Чашки инкубировали сутки при 30<sup>0</sup>С крышками вверх. Визуально оценивали диаметр зон подавления роста, а также диаметр зоны ингибирования чувства кворума (неокрашенный бактериальный газон на синем фоне).

#### **2.4.8 Протеомный анализ при помощи масс-спектрометрии**

Исследование тотального протеома проводили при помощи масс-спектроскопии пептидов под руководством доктора Тимо Глаттера на базе Института им. Макса Планка (Timo Glatzer). 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.

Первичная подготовка образцов включала в себя лизис клеток, алкилирование сульфгидрильных групп белка, оценку количества белка по методу Лоури, расщепление белков трипсином, выделение пептидов. Биопленки выращивали в 8-луночных планшетах как описано выше. Таким же образом проводили диспергирование биопленок в фосфатном буфере, и осаждение. Для приготовления лизата к осадку добавляли 100 мкл 2% раствора лаурилсульфата натрия (SLS) и инкубировали при 95 °С в течение 15 мин, каждые 2 мин обрабатывая ультразвуком на гомогенизаторе Vial Tweeter по 30 с. Затем проводили алкилирование 10 мМ йодацетамидом 30 мин при комнатной температуре. Далее лизат центрифугировали и измеряли концентрацию белка в супернатанте по методу Лоури при помощи набора BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) согласно инструкции. После этого проводили обработку трипсином (Promega) из расчета 1 мкг на 50 мкг белка) в 100 мМ растворе бикарбоната аммония и 2% SLS при 30<sup>0</sup>С в течение ночи. SLS удаляли путем

добавления 1.5% ТХУ и центрифугирования, пептиды выделяли при помощи колонок MICRO SPIN COLUMN C18 (Harvard Apparatus) согласно инструкции. Для подготовки к хроматографии образцы высушивали в вакуумном испарителе SpeedVac при 45 °С в течение часа и растворяли в 0.1 % ТХУ.

Для масс-спектрометрии все эксперименты проводили на аппарате Q Exactive Plus в сочетании с системой для хроматографического разделения при низких потоках элюентов Ultimate 3000 Nano RSLC (Thermo Scientific). Разделение выполняли с помощью аналитической иглы Dr. Maisch. Подвижная фаза состояла на 98 % из 0.15% раствора муравьиной кислоты в воде (буфер А) и на 2 % из 0.15% раствора муравьиной кислоты в 99.85% ацетонитриле (буфер В). Пептиды элюировали со скоростью 300 нл/минуту с использованием трехступенчатого линейного градиента: от 98% раствора А и 2% раствора В к 25% раствору В в течение 105 минут, и затем к 35% раствору В в течение 35 минут. Первое сканирование производили при помощи анализатора Orbitrap (разрешающая сила  $R = 70000$ ) с отношением заряда к массе ( $m/z$ ) 200. Затем, 10 ионов с наиболее интенсивным сигналом отбирались для дальнейших экспериментов. Однозарядные частицы исключались из дальнейших экспериментов. Динамическое исключение уже фрагментированных ионов-предшественников производили в течение 30 с, после чего процедуру повторяли. Фрагментация происходила в анализаторе линейной ионной ловушки, энергия столкновения составляла 35 эВ. Сырые данные импортировали в программный пакет Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics), статистическую обработку проводили в программе SafeQuant. Статистически значимыми считали отличия при значении  $q < 0.01$ .

#### **2.4.9 Трансформация *E. coli* W3110 при помощи метода теплового шока**

Данный метод проводили согласно стандартному протоколу. Подращённую до экспоненциальной фазы (ОП540 0.6-0.8) на среде LB при 37 °С культуру охлаждали 10 мин на льду. Затем центрифугировали при 4 °С и осадок дважды промывали 0.1 М раствором  $\text{CaCl}_2$ . После промывки осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора хлорида кальция, выдерживали 1 ч на льду, затем добавляли раствор плазмиды и выдерживали 1 мин при 42 °С с последующим охлаждением на льду в течение 1 мин. Добавляли 1 мл среды LB, инкубировали при 30 °С 1.5 ч, после чего рассеивали культуру на селективную среду LB с антибиотиком канамицином. После 16 ч инкубации чашек при 37 °С колонии трансформантов подращивали на среде с канамицином, и закладывали на хранение, как описано в разделе 2.1.

#### **2.4.10 Определение продукции феназинов штаммами *P. aeruginosa***

Культуру выращивали в колбах на качалке (150 об/мин). Пробы отбирали ежедневно в течение трех суток. Клетки отделяли путем 15-минутного центрифугирования при 5500g. 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. Также 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.

#### **2.4.11 Статистическая обработка результатов**

Все эксперименты проводили как минимум в трех независимых 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 v 7.0 и R-Studio с указанием средних значений и стандартных отклонений. Обработку результатов проводили в программном пакете Microsoft Office Excel 2007.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

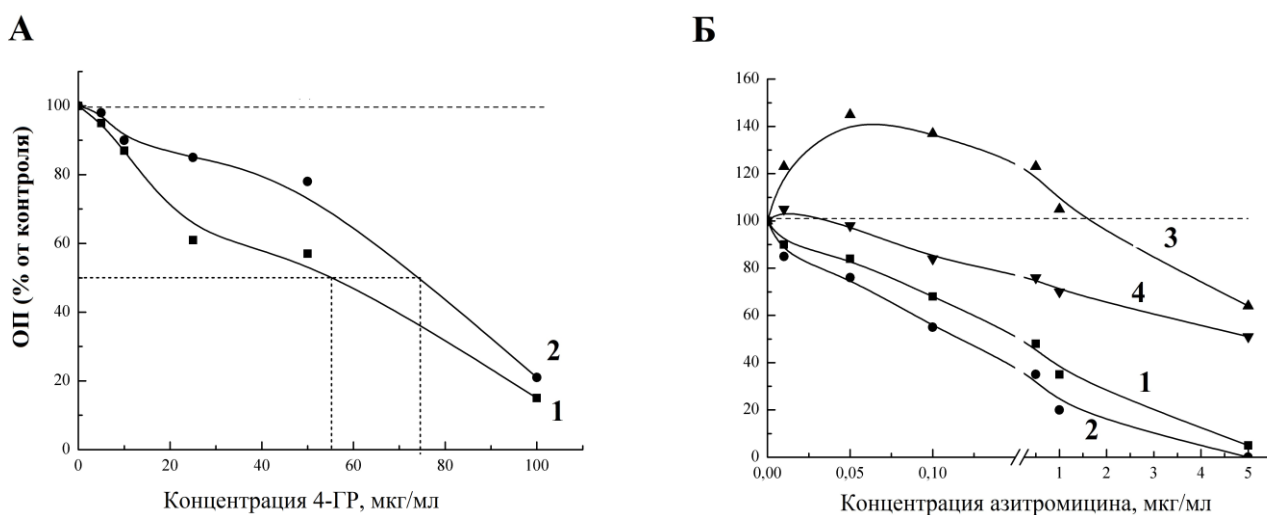
### 3.1. Действие антибиопленочных агентов

#### 3.1.1 Действие 4-гексилрезорцина на биопленки модельных микроорганизмов.

##### Устранение эффекта стимуляции роста биопленок азитромицином

*D. natronolimnaea* 26-10 является хорошей моделью для выполнения данной задачи, поскольку род *Dietzia* включает в себя как сапротрофных, так и условно-патогенных представителей. Азитромицин стимулирует рост биопленок этой бактерии (рис. 2), как показывает окрашивание DMMB (напомним, что DMMB окрашивает преимущественно матрикс биопленки).

Определение влияния 4-гексилрезорцина (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. 2А). 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. В этих и в дальнейших экспериментах в качестве контроля использован вариант опыта без ингибиторов.



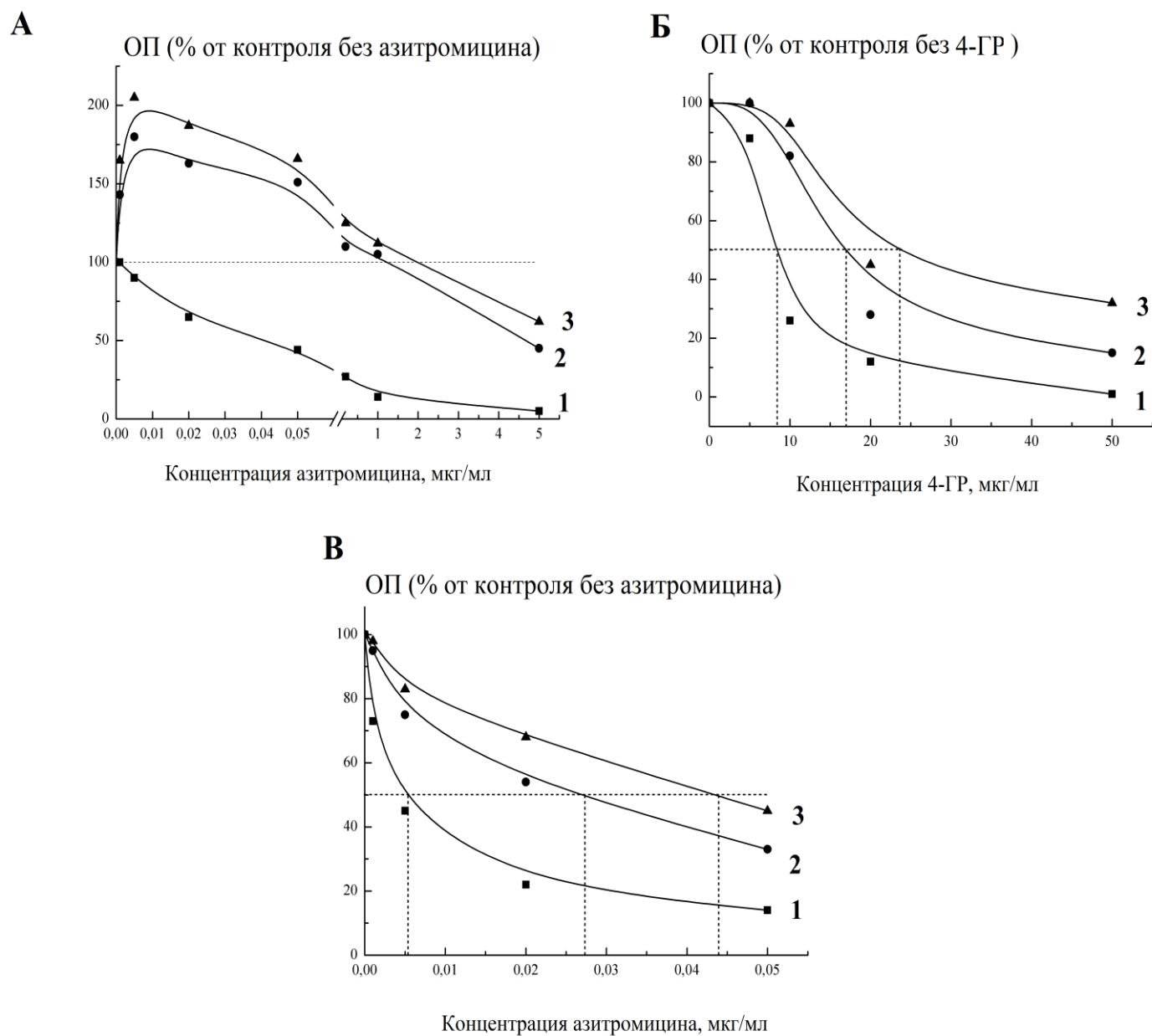
**Рисунок 2** — Действие 4- ГР и азитромицина на рост планктонных культур и биопленок *D. natronolimnaea*: А – действие 4-ГР, планктонная культура (1), биопленка (2); Б – действие азитромицина (1, 3) и смеси азитромицина и 4-ГР (10 мкг/мл) (2, 4) на рост планктонной культуры (1, 2) и биопленки (3, 4),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

*K. rhizophila*. Для данного микроорганизма показана заметная стимуляция роста биопленок при субингибиторных концентрациях азитромицина (рис. 3А), особенно полисахаридных компонентов матрикса (как показывает окрашивание DMMB). Так же, как и

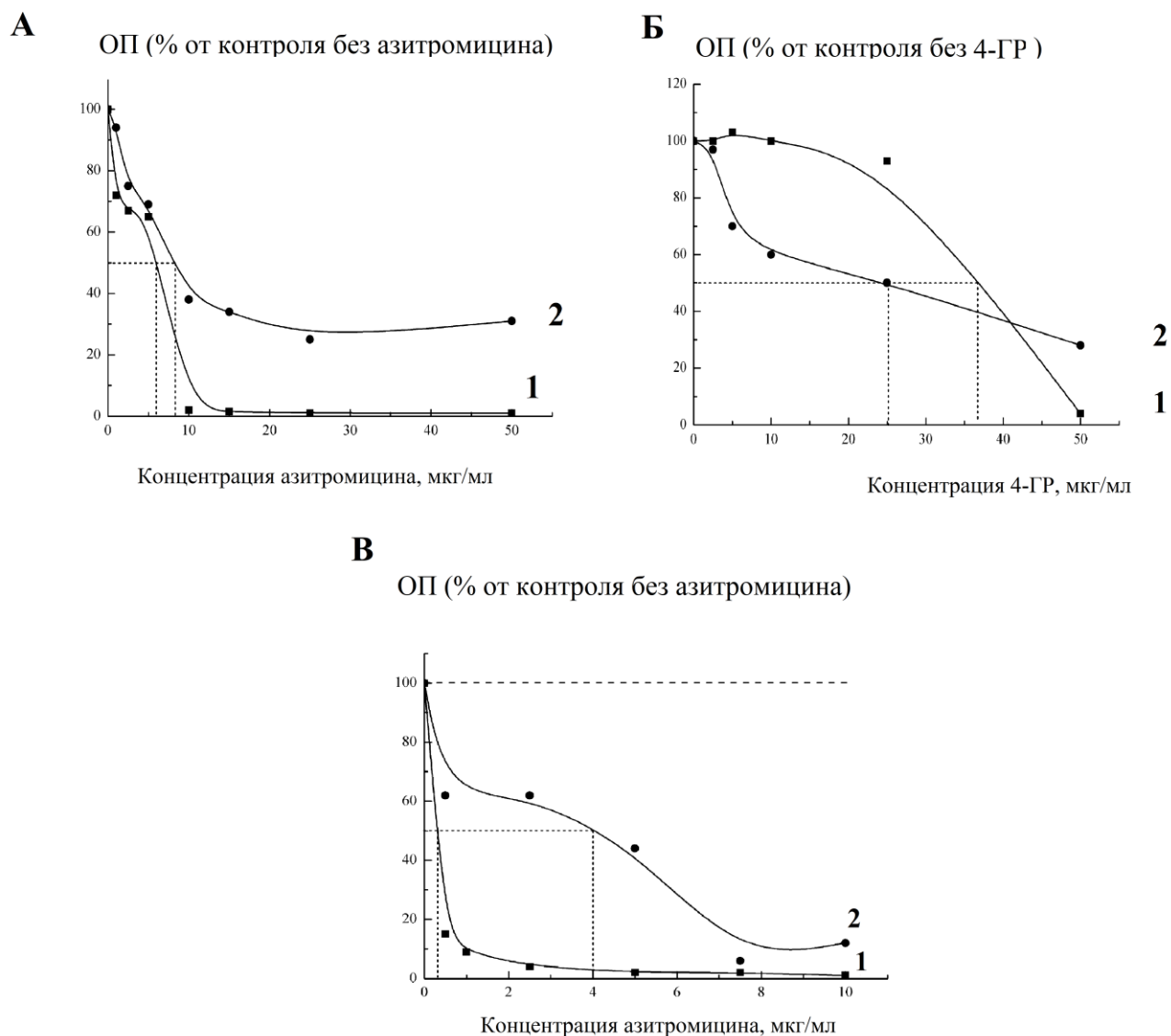


в случае с *D. natronolimnaea*, не обнаружено значительной разницы в чувствительности к 4-ГР для планктонной культуры и биопленки (рис. 3Б): ИД<sub>50</sub> для планктонной культуры и биопленки, соответственно, равны 7.5 и 16 мкг/мл (при окрашивании ДММВ) и 24 мкг/мл (при окрашивании КФ). Однако уже 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 (рис. 3В).

***R. 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 все равно имеет место как в отношении планктонных культур, так и биопленок (рис. 4). 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).

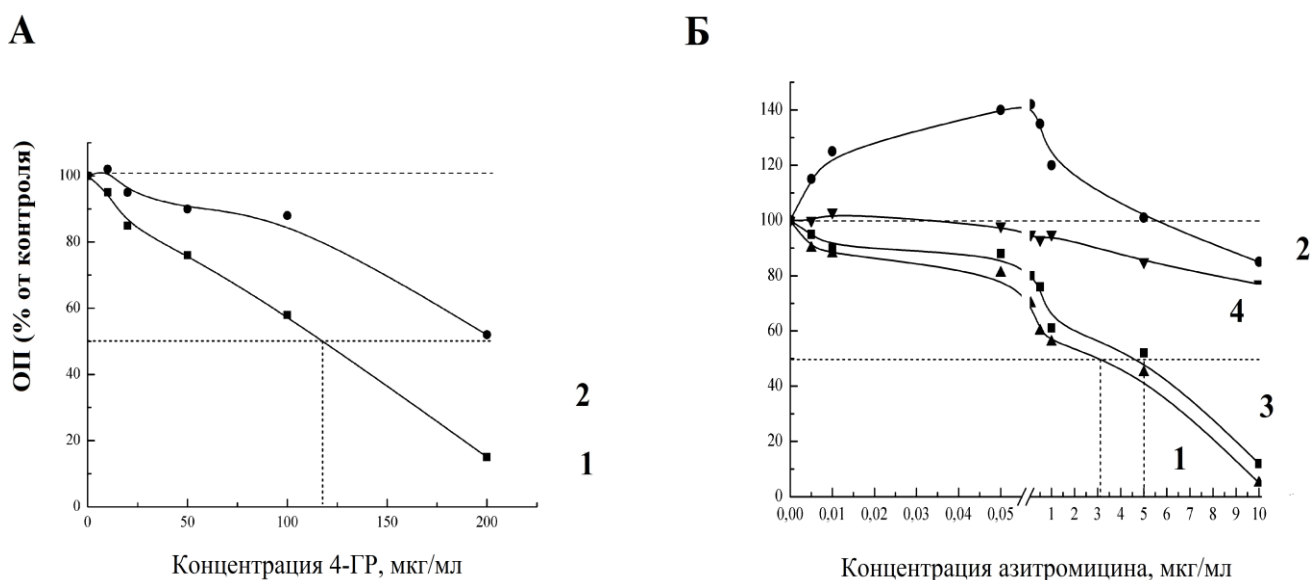


**Рисунок 3** — Действие 4-ГР и азитромицина на рост планктонных культур и биопленок *K. rhizophila*: А – действие азитромицина, Б – действие 4-ГР, В – совместное действие азитромицина и 4-ГР (5 мкг/мл), планктонная культура (1), биопленка (2, 3), окрашенная ДММВ (2) или КФ (3).



**Рисунок 4** — Действие 4-ГР и азитромицина на рост планктонных культур (1) и биопленок (2) *R. equi*: А – действие азитромицина, Б – действие 4-ГР, В – совместное действие азитромицина и 4-ГР (30 мкг/мл), планктонная культура (1), биопленка (2), биопленка окрашена ДММВ.

*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, рис. 5). 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 (рис. 5), а главное – полностью снимается эффект стимуляции синтеза биопленки при субингибиторных концентрациях азитромицина (0.05 – 5 мкг/мл).

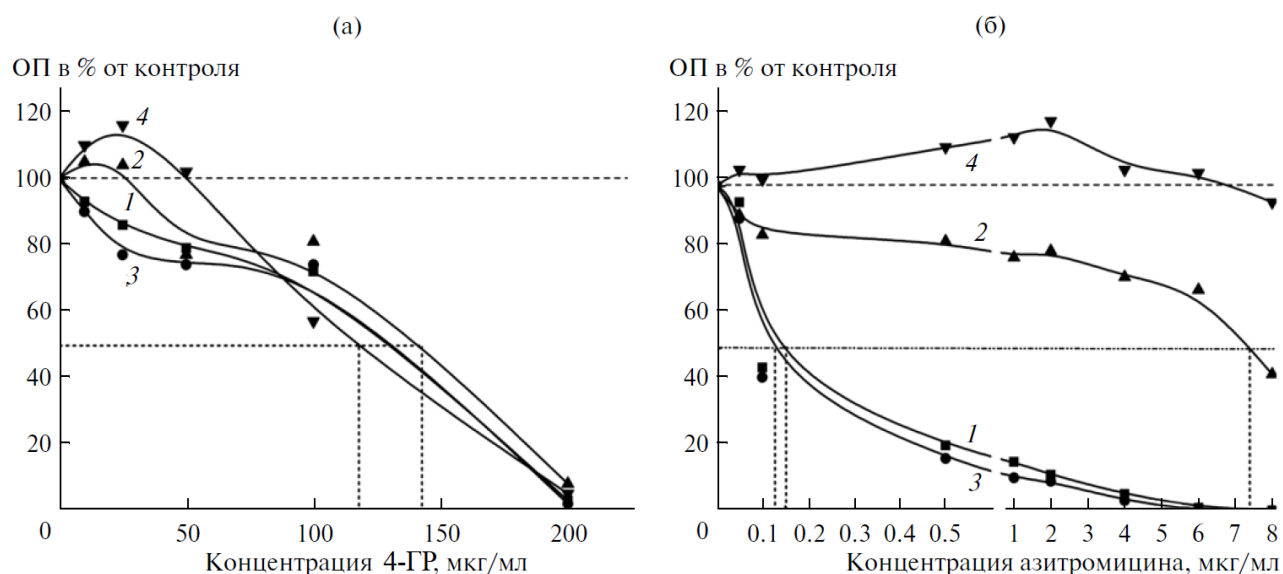


**Рисунок 5** — Действие 4-ГР и азитромицина на рост планктонных культур и биопленок *P. chlororaphis* 66: слева – действие 4-ГР, планктонная культура (1), биопленка (2); справа – действие азитромицина (1, 2) и смеси азитромицина и 4-ГР (20 мкг/мл) (3, 4), планктонные культуры (1, 3), биопленки (2, 4), биопленка окрашена ДММВ.

*C. violaceum*. В данной работе использовали штамм WT и его мутант CV026, неспособный к синтезу АГЛ (см. табл. 1). Стимуляция азитромицином роста биопленок мутанта CV026 выражена гораздо слабее и сдвинута в сторону меньших концентраций антибиотика по сравнению со штаммом WT. Как было показано ранее (Стрелкова с соавт., 2012), эффект стимуляции выражается в преимущественном синтезе матрикса, поэтому, как можно ожидать, у штамма с дефектом его синтеза данный эффект оказался 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) (рис. 6а). При этом 4-ГР в низких концентрациях (до 50 мкг/мл) вызывает даже некоторую степень стимуляции роста биопленки мутанта CV026.

При совместном действии азитромицина и 4-ГР (25 мкг/мл) чувствительность роста планктонных культур обоих штаммов и биопленок штамма дикого типа существенно не изменяется (рис. 6б). Однако, как и в предыдущих случаях, эффект стимуляции роста биопленок у штамма дикого типа полностью снимается. В то время как у мутанта в

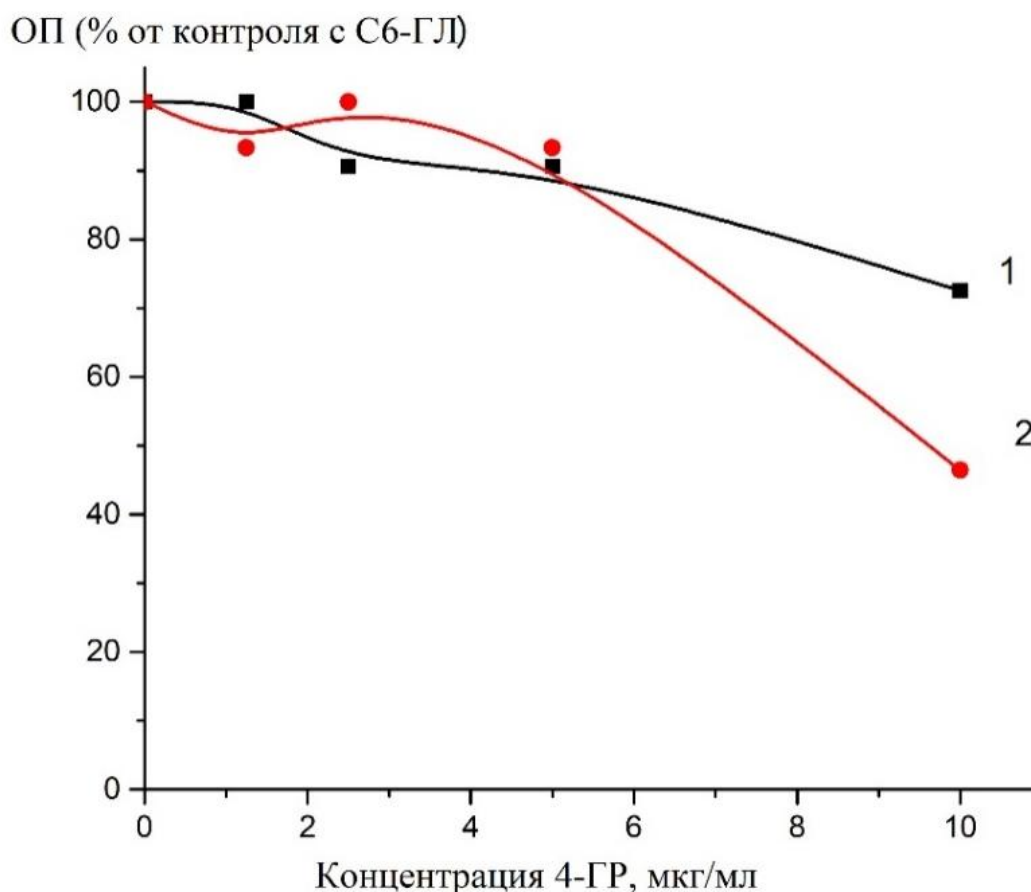
присутствии 4-ГР азитромицин вызывает заметную стимуляцию роста биопленок, что может свидетельствовать о регуляторном вмешательстве 4-ГР в этот процесс. Предполагалось, что 4-ГР в данном случае может имитировать действие молекул АГЛ.



**Рисунок 6** — Действие 4-ГР и азитромицина на рост планктонных культур и биопленок *S. 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.

Таким образом, был показан выраженный антибиопленочный эффект 4-гексилрезорцина для модельных микроорганизмов. Несмотря на то, что чувствительность к 4-ГР выше для грамположительных бактерий, для всех исследуемых бактерий снимался эффект стимуляции роста биопленок низкими с концентрациями азитромицина при сочетании с 4-ГР.



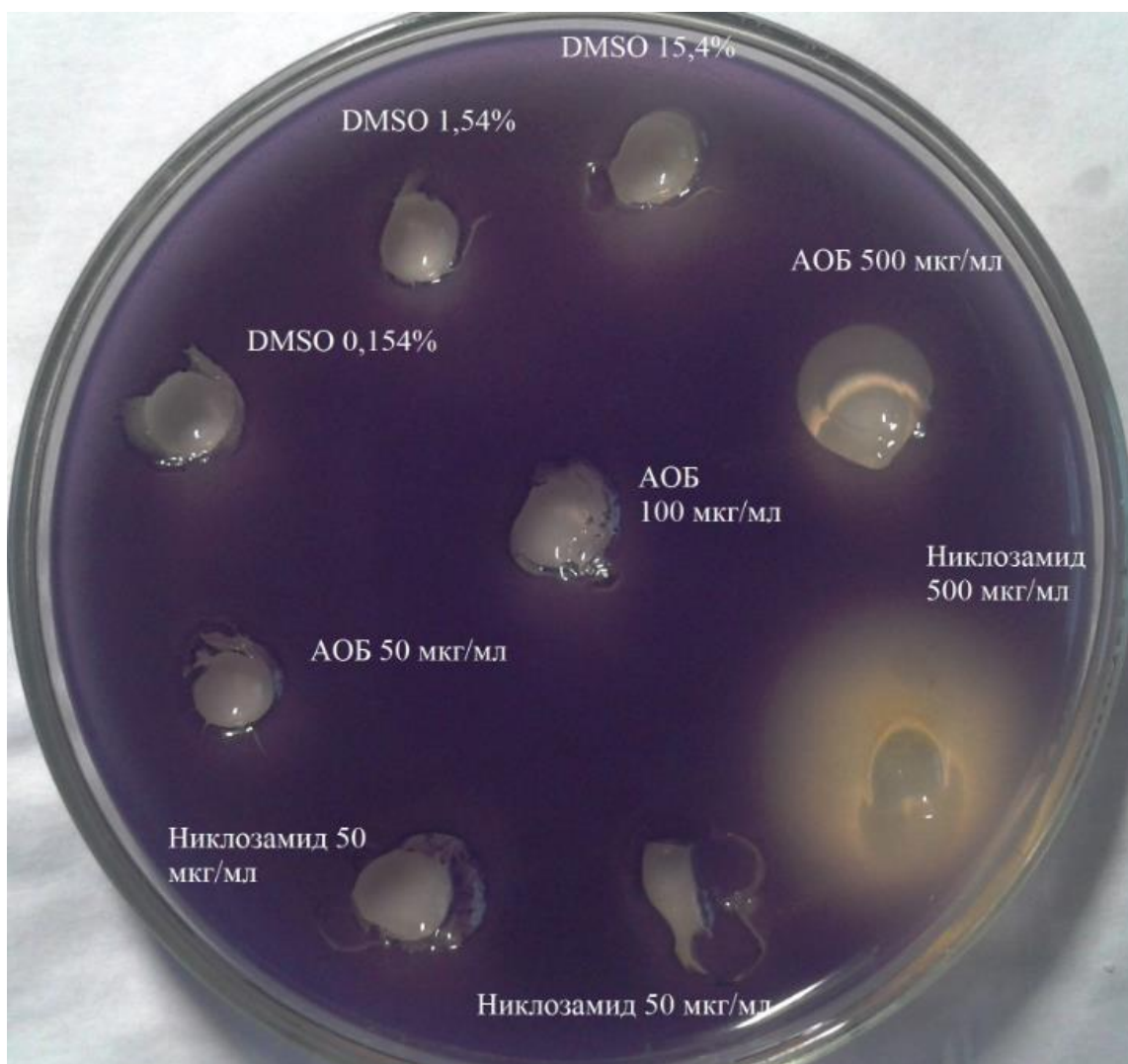
**Рисунок 7** — Влияние 4-ГР на рост планктонной культуры (1), и синтеза виолацеина (2) при добавлении 0.1 мкг/мл С6-ГЛ

### 3.1.2 Никлозамид как антибиопленочный агент

#### 3.1.2.1 Антикворумная активность никлозамида в отношении хромобактерий и псевдомонад

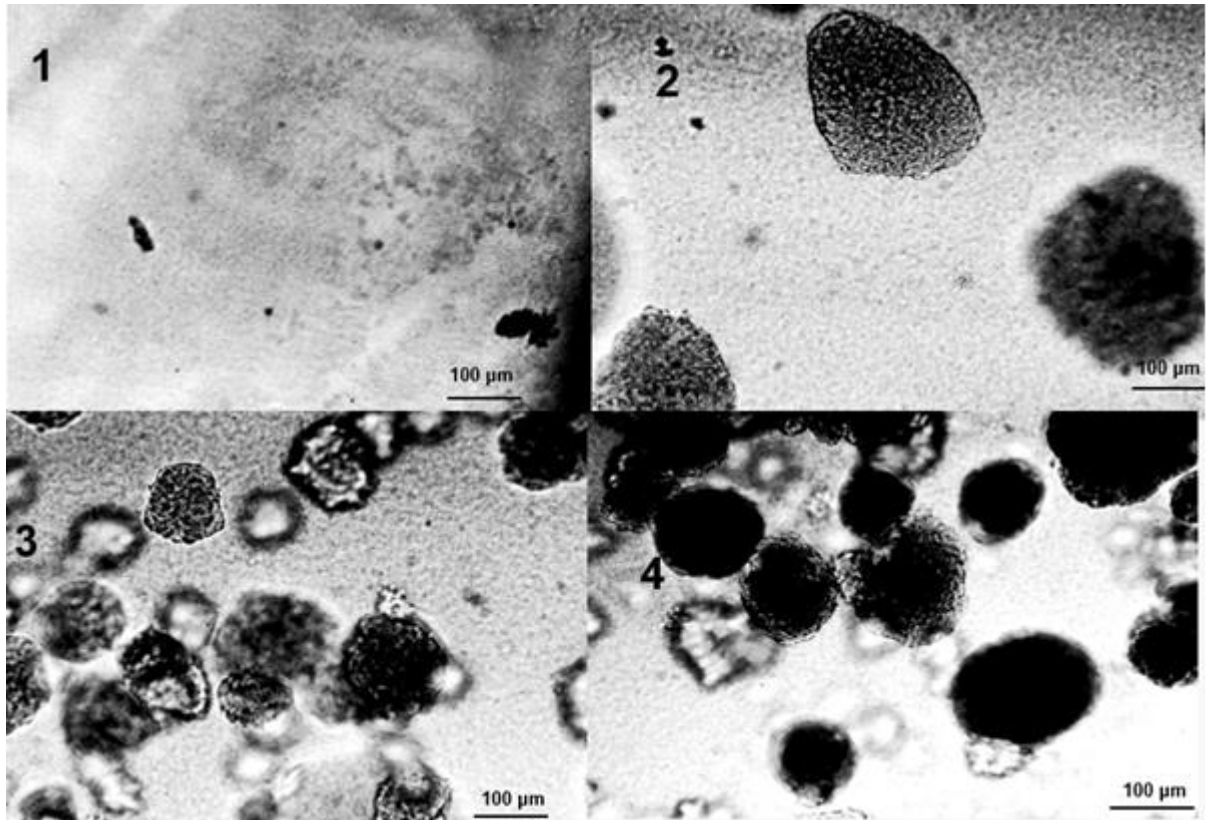
*C. violaceum*. Антикворумную активность никлозамида оценивали методом лунок (как описано в главе «материалы и методы») Тестовые концентрации составляли 50 и 500 мкг/мл. Для сравнения использовали 4-ГР в концентрациях 50 и 100 мкг/мл, не обладающий противокворумной активностью, как было показано ранее. Контролем служили лунки с ДМСО в той же концентрации, что и в тестируемых растворах соединений. Зона ингибирования синтеза виолацеина как меры антикварумной активности составляла около 1 см при самой высокой концентрации. Однако в данной зоне отмечалось также значительное

подавление роста, что говорит также о возможном бактериостатическом или бактерицидном эффекте никлозамида. Вокруг контрольной зоны с ДМСО диаметр зоны ингибирования примерно в 2 раза меньше.



**Рисунок 8** — Чашка с лунками на бактериальном газоне CV026, с добавлением АГЛ. АОБ – обозначение 4-гексилрезорцина.

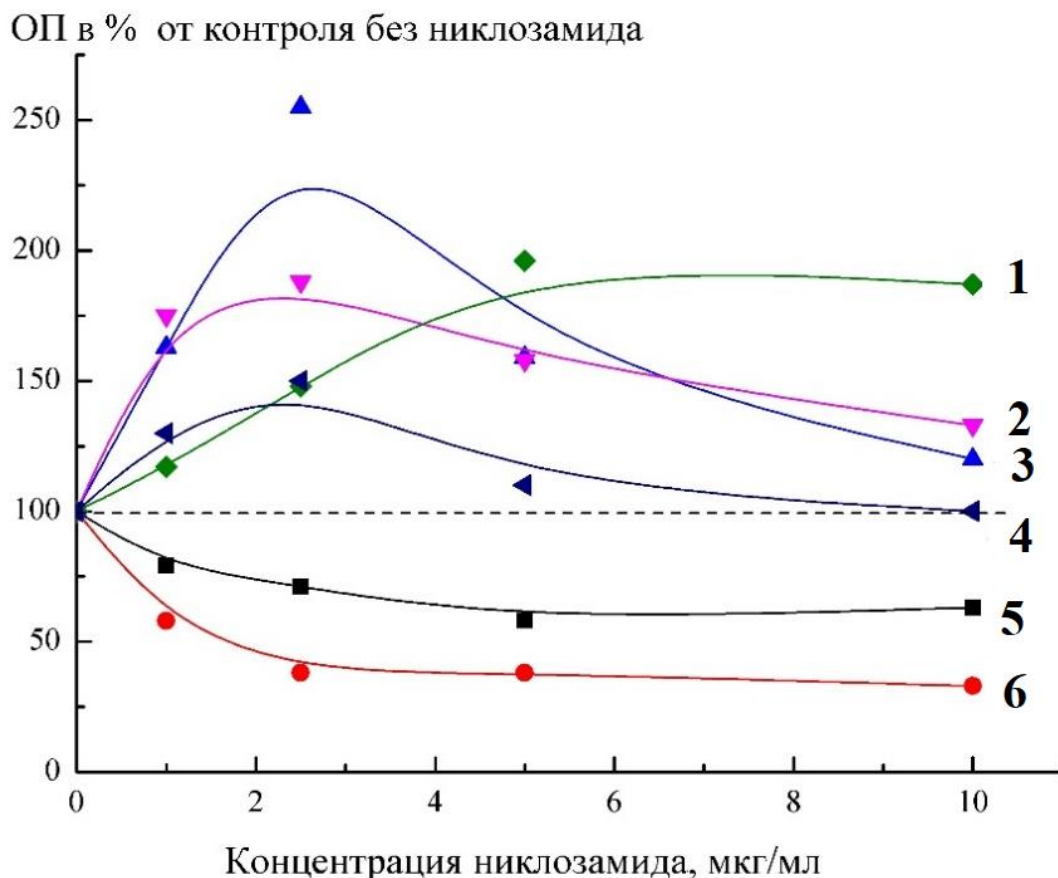
Для проверки этого предположения была проведена световая микроскопия зон ингибирования (рис. 9.). В зоне 1 рост микроорганизмов полностью подавлен. Наблюдали частичное его восстановление в зонах 2 и 3 и полное восстановление в зоне 4. При этом по мере увеличения числа микроколоний возрастает и интенсивность окрашивания. Таким образом, на основании этих результатов сделать вывод о специфическом ингибировании никлозамидом систем бактериальных QS нельзя. По-видимому, мишенью никлозамида являются самые различные метаболические пути, что приводит не только к подавлению синтеза виолацеина, но и роста бактерий.



**Рисунок 9** — Световая микроскопия зон ингибирования вокруг лунки с 500 мкг/мл. Фотографии расположены по мере удаления от края лунки(1-4). Воздействие никлозамида на рост биопленок хромобактерий в сравнении с планктонной культурой оценивали при помощи метода тефлоновых кубиков.

Сравнивали штамм дикого типа WT и мутант, неспособный к синтезу АГЛ. Результаты представлены на рис. 10



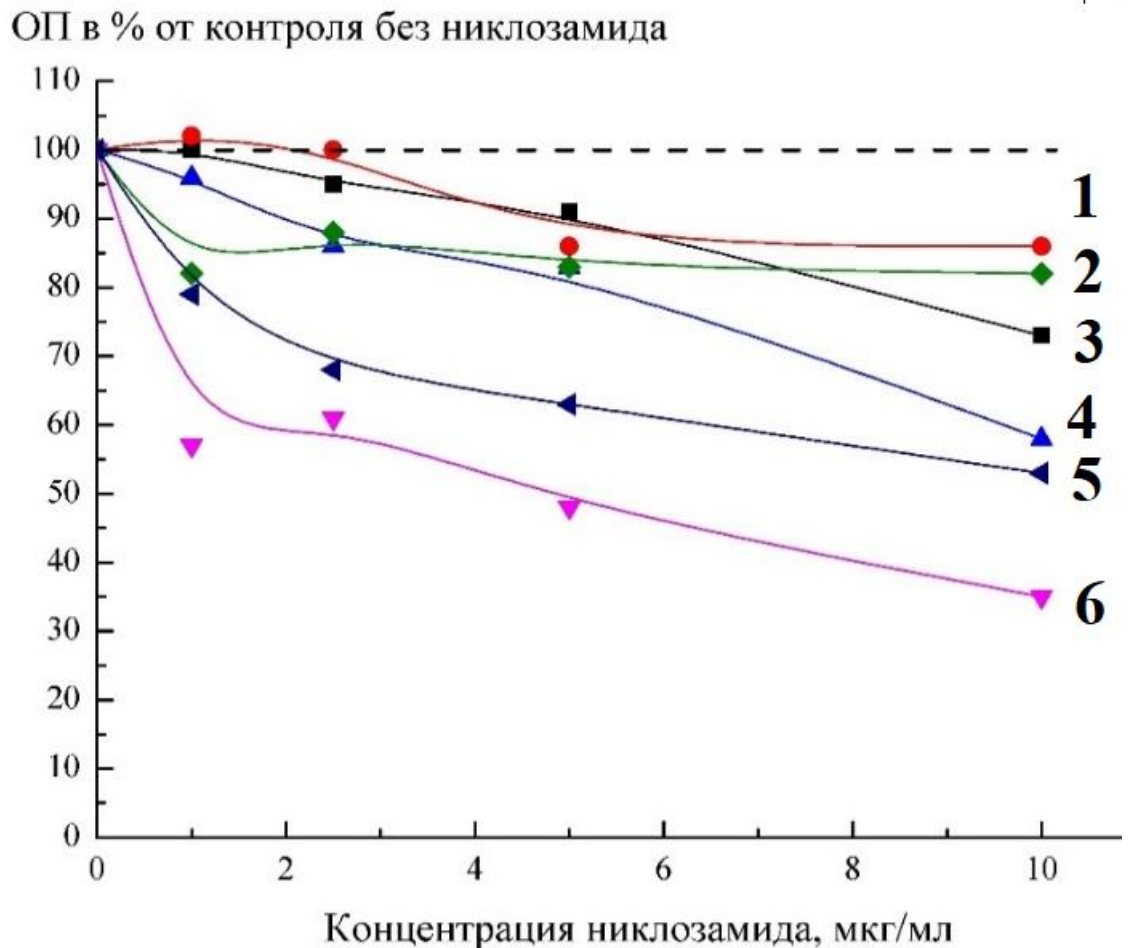


**Рисунок 10** — Действие никлозамида на рост планктонных культур и биопленок *S. violaceum*: штамм дикого типа WT (2, 3, 5,), мутант CV026 (1, 4, 6), планктонные культуры (5, 6), биопленки, окрашенные КФ, (1, 3) и DMMB (2, 4).

Рост биопленок как штамма дикого типа, так и мутанта, значительно стимулируется низкими концентрациями никлозамида. Эффект стимуляции выражен слабее при окрашивании DMMB для обоих штаммов, что может говорить об увеличении клеточной компоненты биопленки, а не матриксной. Однако при 10 мкг/мл эффект стимуляции для штамма WT убывает, а для мутанта рост биопленок по-прежнему превышает контроль. Кривая стимуляции для штамма дикого типа имеет вид «колокола», в то время как для штамма CV026 характерен плавный подъем с выходом на плато. Более того, при окрашивании КФ максимум роста для биопленки штамма WT наблюдается при 2.5 мкг/мл, а для биопленки мутанта при 5 мкг/мл. Рост планктонной культуры обоих штаммов ингибируется до 5 мкг/мл никлозамида, а далее выходит на плато, причем мутантный штамм оказался более чувствительным (ИД<sub>50</sub> 2.3 мкг/мл), в то время как для штамма WT ИД<sub>50</sub> превышает 10 мкг/мл. При 20 мкг/мл для штамма WT рост планктонной культуры полностью подавлен, в то время как рост биопленки продолжает сохраняться на уровне контроля (данные не показаны).

При выращивании биопленок хромобактерий на фильтрах из стекловолокна эффект стимуляции не наблюдался, а штамм CV026 оказался более устойчивым. Можно предположить, что никлозамид, помимо интерференции с системами QS, влияет также на начальные этапы адгезии бактериальных клеток и созревания биопленок, находящихся в равновесии с планктонной культурой (которая отсутствует при росте биопленок на фильтрах). Для объяснения подобных результатов требуются дополнительные исследования.

***P. aeruginosa* PAO1.** Результаты, полученные методом тefлоновых кубиков для штамма PAO1 дикого типа, и PAO1 6863, неспособного к синтезу АГЛ, приведены на Рисунок 11. Для данного микроорганизма стимуляция роста биопленок низкими концентрациями никлозамида гораздо менее выражена.



**Рисунок 11** — Действие никлозамида на рост планктонных культур и биопленок *P. aeruginosa*: штамм дикого типа PAO1 (3, 4, 6), мутант PAO1 pME6863 (1,2,5), планктонные культуры (1, 3), биопленки, окрашенные КФ (2, 4) и DMMB (5, 6).

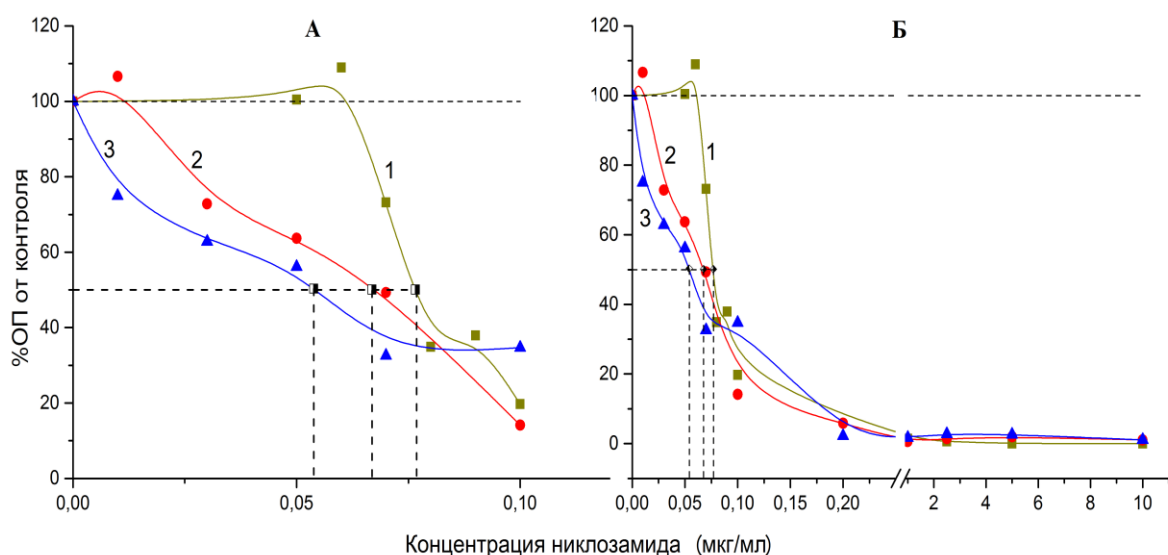
Рост планктонных культур обоих штаммов ингибируется никлозамидом незначительно, хотя дикий тип несколько более чувствителен. Эффекта стимуляции не наблюдалось, хотя биопленки сохраняют устойчивость даже при максимальной

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 DMMB (ИД<sub>50</sub> 5 мкг/мл) по сравнению с КФ, что свидетельствует о преимущественном подавлении синтеза матрикса. Интересен тот факт, что биопленки мутантного штамма с дефектной системой QS оказались в целом более устойчивыми, что согласуется с данными Imperi с соавторов об ингибировании никлозамидом системы quorum sensing (Imperi et al., 2013).

Так же, как для хромобактерий, при выращивании псевдомонад на фильтрах из стекловолокна нечувствительными к никлозамиду оказались оба штамма (данные не показаны).

### **3.1.2.2 Влияние никлозамида на рост биопленок грамположительных бактерий**

В данной части работы использовали как модельные сапротрофные организмы (*K. rhizophila* DC2201, *D. natronolimnaea* 2610-1, *S. aureus* 209P), так и симбионты кожи человека (*M. luteus* C01, *K. schroeteri* H01, *S. aureus* MFP03). Биопленки выращивали на фильтрах из стекловолокна (без равновесия с планктонной культурой) и на тефлоновых кубиках (в присутствии планктонной культуры). Значения ИД<sub>50</sub> для модельных штаммов определяли в опытах с фильтрами. Они приведены в табл. 2. В целом все исследуемые организмы демонстрировали высокую чувствительность к никлозамиду (рис. 12А, рис. 14.). Количество метаболически активных клеток в биопленке значительно снижается уже при 0.1 мкг/мл (до 86% у штамма *M. luteus* C01), и падает практически до нуля при 1 мкг/мл никлозамида (рис. 12В). 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 *S. aureus* MFP03 (0.08 мкг/мл).



**Рисунок 12** — Влияние никлозамида на рост биопленок микроорганизмов кожной микробиоты. Выращивание на фильтрах из стекловолокна (окрашивание МТТ). А – диапазон малых концентраций; Б – полный диапазон концентраций. 1 – *S. aureus* MFP03; 2 – штамм *M. luteus* C01; 3 – штамм *K. schroeteri* H01. ИД<sub>50</sub> соответствуют пересечения перпендикулярных линий с осью абсцисс. Пунктирная линия – контроль без ингибитора.

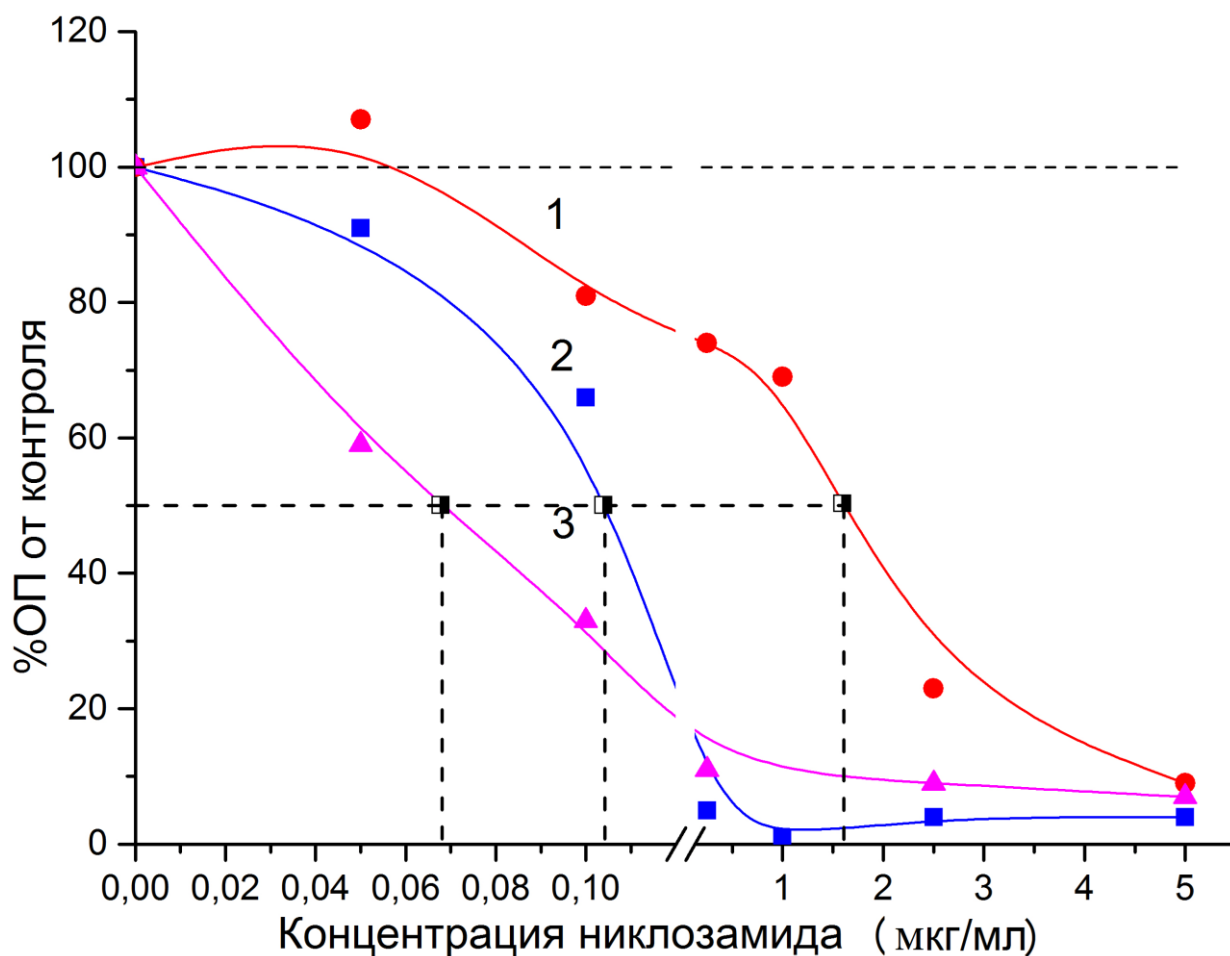
**Таблица 2.** — Значения ИД<sub>50</sub> никлозамида для избранных грамположительных штаммов.

Штамм	ИД <sub>50</sub> , мкг/мл
<i>S. aureus</i> MFP03	0.077
<i>S. aureus</i> 209P	0.05
<i>M. luteus</i> C01	0.067
<i>K. schroeteri</i> H01	0.054
<i>K. rhizophila</i> DC2201	0.174
<i>D. natronolimnaea</i> 2610-1	0.018

Для более полной картины действия никлозамида на рост *K. rhizophila* DC2201 были проведены дополнительные опыты по выращиванию биопленок на тефлоновых кубиках. Результаты приведены на рис. 13. 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 матрикса данной культурой, которое было показано в наших предыдущих опытах. Можно предположить, что в данном случае никлозамид не влияет, а может быть и усиливает синтез матрикса в биопленке. ИД<sub>50</sub> при

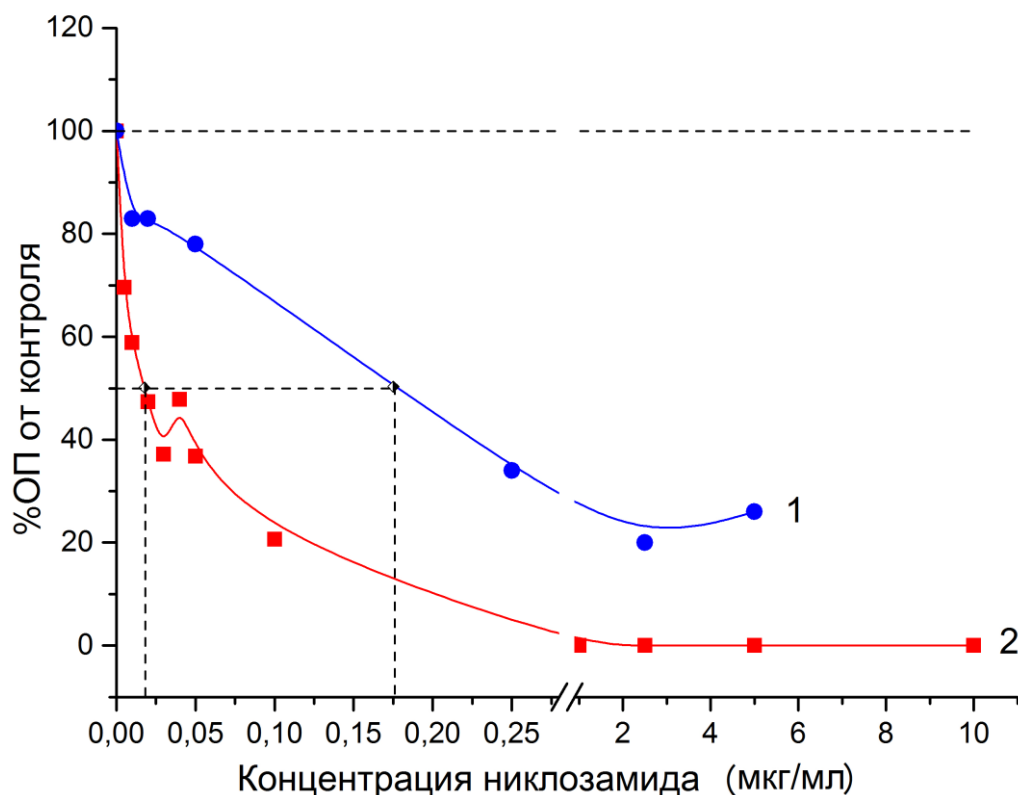
окрашивании МТТ на кубиках почти в 2 раза меньше, чем при окрашивании МТТ на фильтрах. Поскольку при выращивании биопленки на фильтрах равновесие с планктонной культурой отсутствует, можно сделать вывод о том, что никлозамид воздействует на начальные этапы формирования биопленки.

Никлозамид обладает бактериостатическим действием, на что указывает возобновление роста биопленок *K. rhizophila* DC2201 до уровня контроля (данные не приведены) после переноса фильтра с поверхности агаризованной среды LB, содержащей 5



мкг/мл никлозамида, на поверхность среды LB без ингибитора.

**Рисунок 13** — Действие никлозамида на рост *K. rhizophila* DC2201. Выращивание биопленок на тefлоновых кубиках. 1 – биопленки, окрашенные КФ; 2 – планктонная культура; 3 – биопленки, окрашенные МТТ. Обозначения, как на рис. 12.



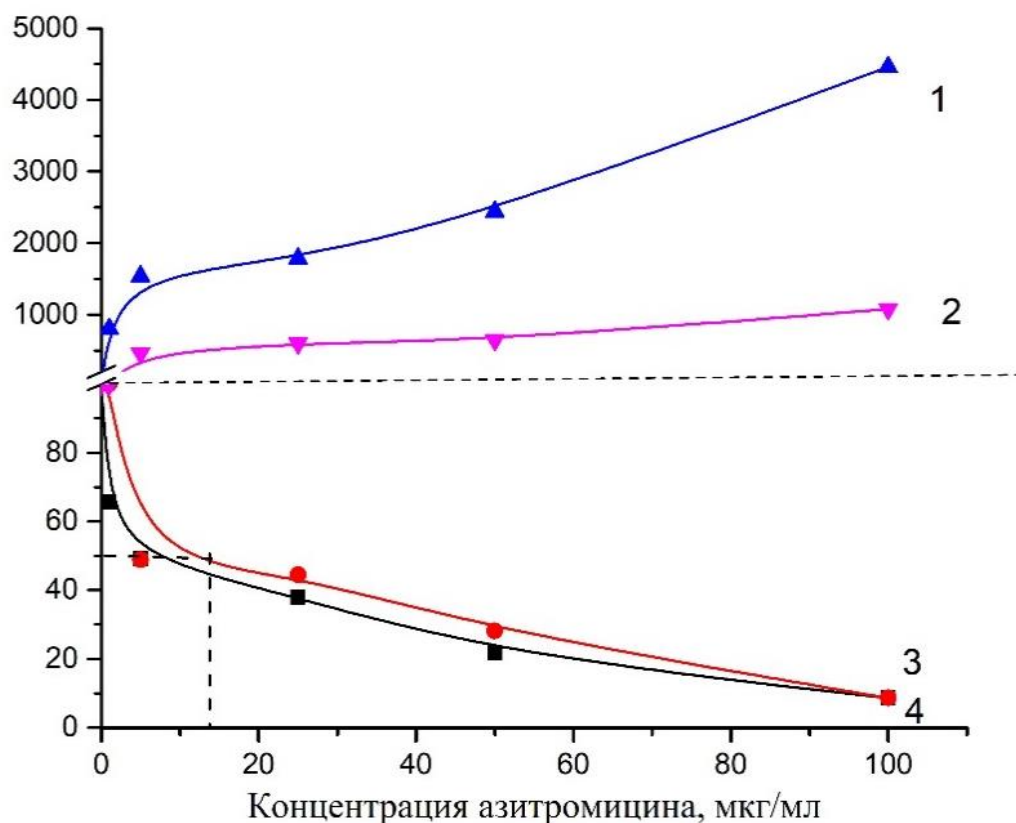
**Рисунок 14** — Влияние никлозамида (мкг/мл) на рост биопленок, выращенных на фильтрах из стекловолокна (окрашивание МТТ). 1 – *K. rhizophila* DC2201; 2 – *D. natronolimnaea* 2610-1.

### 3.1.2.3 Синергидный эффект никлозамида и азитромицина

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* 209P и *K. rhizophila* DC2201.

***P. aeruginosa***. Биопленки выращивали на тефлоновых кубиках, окрашивали КФ. Данный микроорганизм является чрезвычайно устойчивым к азитромицину. 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 (рис. 15). Добавление никлозамида в концентрации 10 мкг/мл практически не меняет чувствительность планктонной культуры, однако заметно снимает стимуляцию роста биопленок азитромицином.

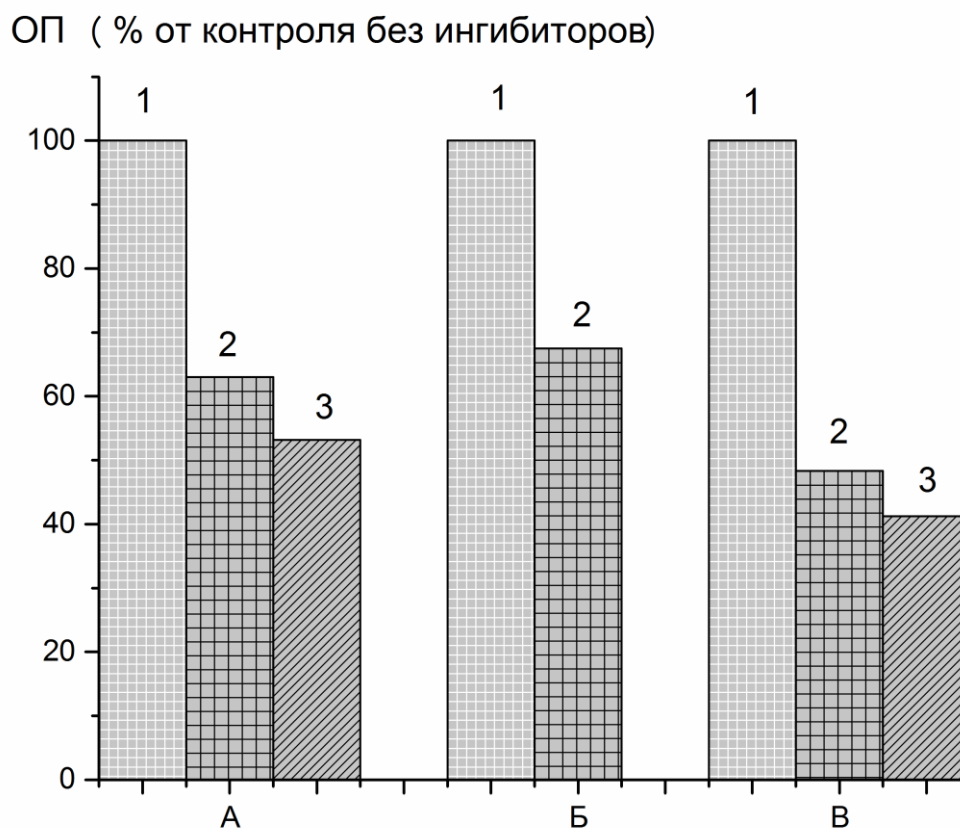
ОП (% контроля без ингибиторов)



**Рисунок 15** — Влияние азитромицина (3,1), и азитромицина в сочетании с 10 мкг/мл никлозамида (2, 4) на рост планктонных культур (3, 4) и биопленок (1, 2) *P. aeruginosa* PAO1. Биопленка окрашена КФ. Пунктирной линией обозначен уровень контроля.

Для грамположительных микроорганизмов концентрации азитромицина и никлозамида подбирали с тем расчетом, чтобы легче было зарегистрировать совместный эффект: Каждое из соединений по отдельности ингибировало рост биопленок на 30 – 60%. Биопленки выращивали на поверхности фильтров из стекловолокна и окрашивали МТТ.

При сочетании никлозамида в концентрации 0.025 мкг/мл с азитромицином наблюдался слабый аддитивный эффект для *S. aureus* 209 P (рис. 16).

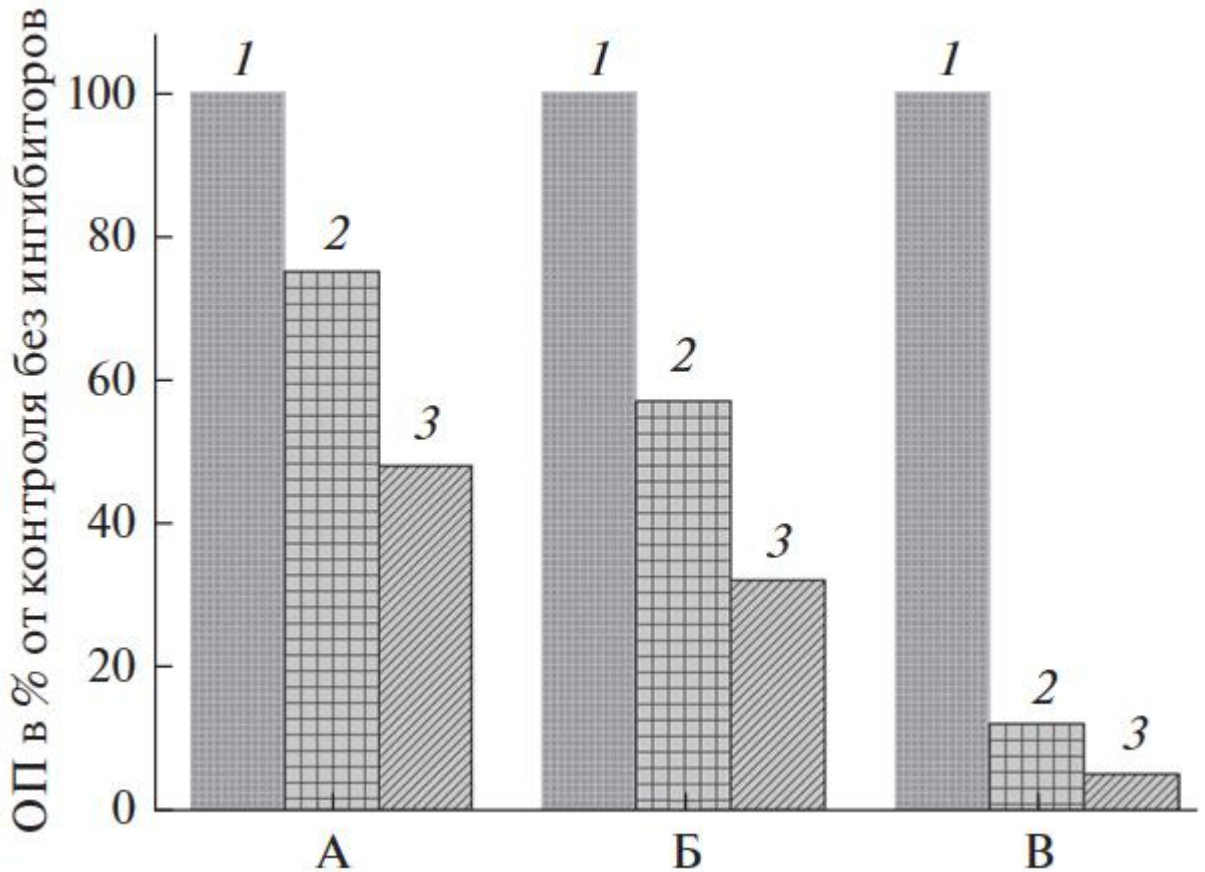


**Рисунок 16** — Действие азитромицина, а также азитромицина в сочетании с 0.025 мкг/мл никлозамида на формирование биопленок *S. aureus* 209 P на фильтрах из стекловолна (окрашивание МТТ). 1-Контроль без ингибиторов. А. 2 – азитромицин , 0.25 мкг/мл; 3 – азитромицин , 0.5 мкг/мл. Б. 2 -никлозамид, 0.025 мкг/мл; В. 2 – никлозамид, 0.025 мкг/мл + азитромицин, 0.25 мкг/мл; 3 – никлозамид, 0.025 мкг/мл + азитромицин, 0.5 мкг/мл.

Более выраженное синергидное ингибиторное действие оказывало сочетание никлозамида с азитромицином на биопленки *K. rhizophila* DC2201 (рис. 17).

Таким образом, никлозамид может быть эффективным компонентом для бинарных антибиопленочных препаратов. Во-первых, он производится в промышленных масштабах во всем мире и в России, в частности, что удешевляет создание комплексных антибиопленочных препаратов. Кроме того, он обладает очень высокой активностью: сотые доли мкг/мл снижают количество метаболически активных клеток в биопленках на 50%. Но самое главное преимущество заключается в том, что никлозамид не токсичен в используемых концентрациях для организма-хозяина, поскольку его терапевтические дозы как антигельминтного препарата составляют несколько граммов на прием.

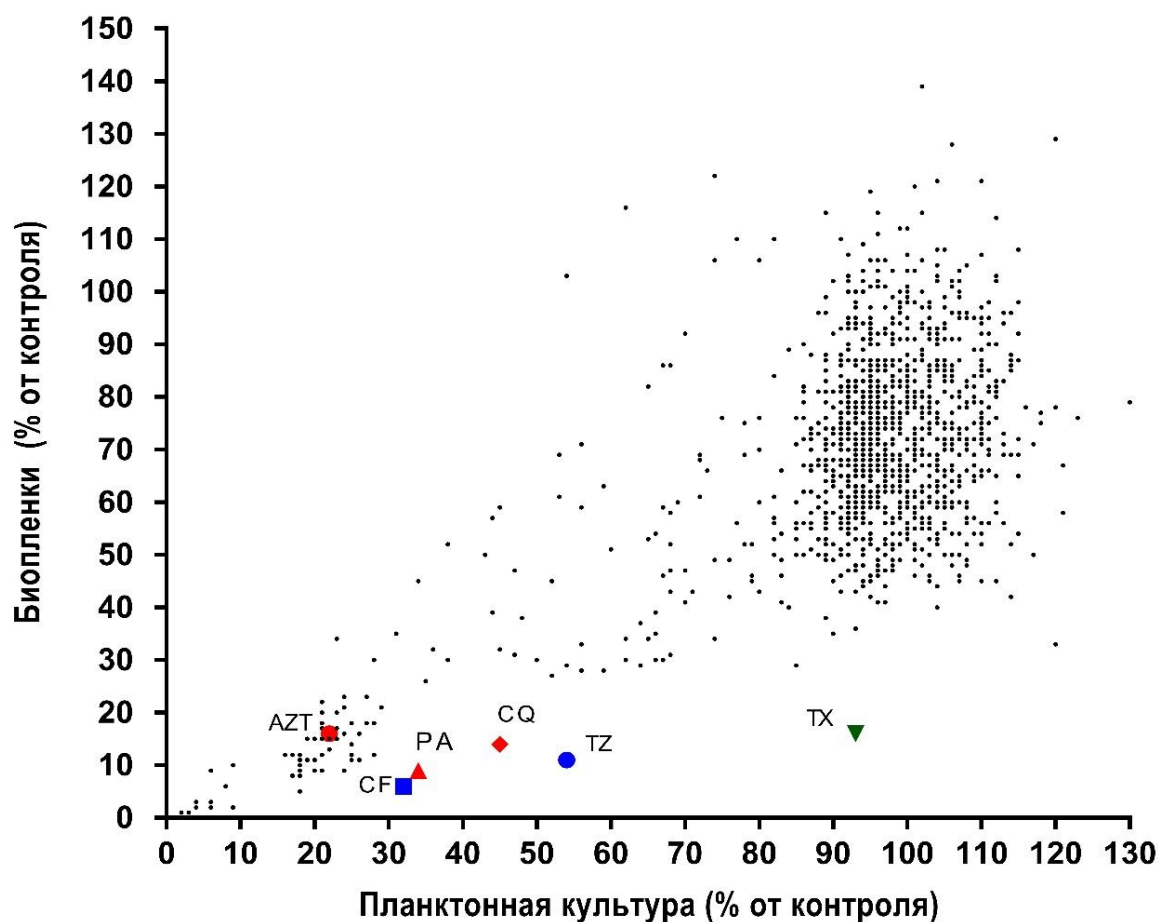




**Рисунок 17** — Действие никлозамида и азитромицина (по отдельности и в комбинации друг с другом) на формирование биопленок *K. rhizophila* DC2201 на фильтрах из стекловолокна (окрашивание МТТ). 1- Контроль без ингибиторов. А. 2 – азитромицин, 0.01 мкг/мл; 3 – азитромицин, 0.05 мкг/мл. Б. 2 -никлозамид, 0.1 мкг/мл; 3 – никлозамид, 0.25 мкг/мл. В. 2 – никлозамид, 0.1 мкг/мл + азитромицин, 0.01 мкг/мл; 3 – никлозамид, 0.1 мкг/мл + азитромицин, 0.05 мкг/мл.

### 3.1.3 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 биопленки оценивали с помощью метода иммунологических планшетов. Все соединения брали в концентрации 10 мкМ. Результаты обозначены на рис. 18.

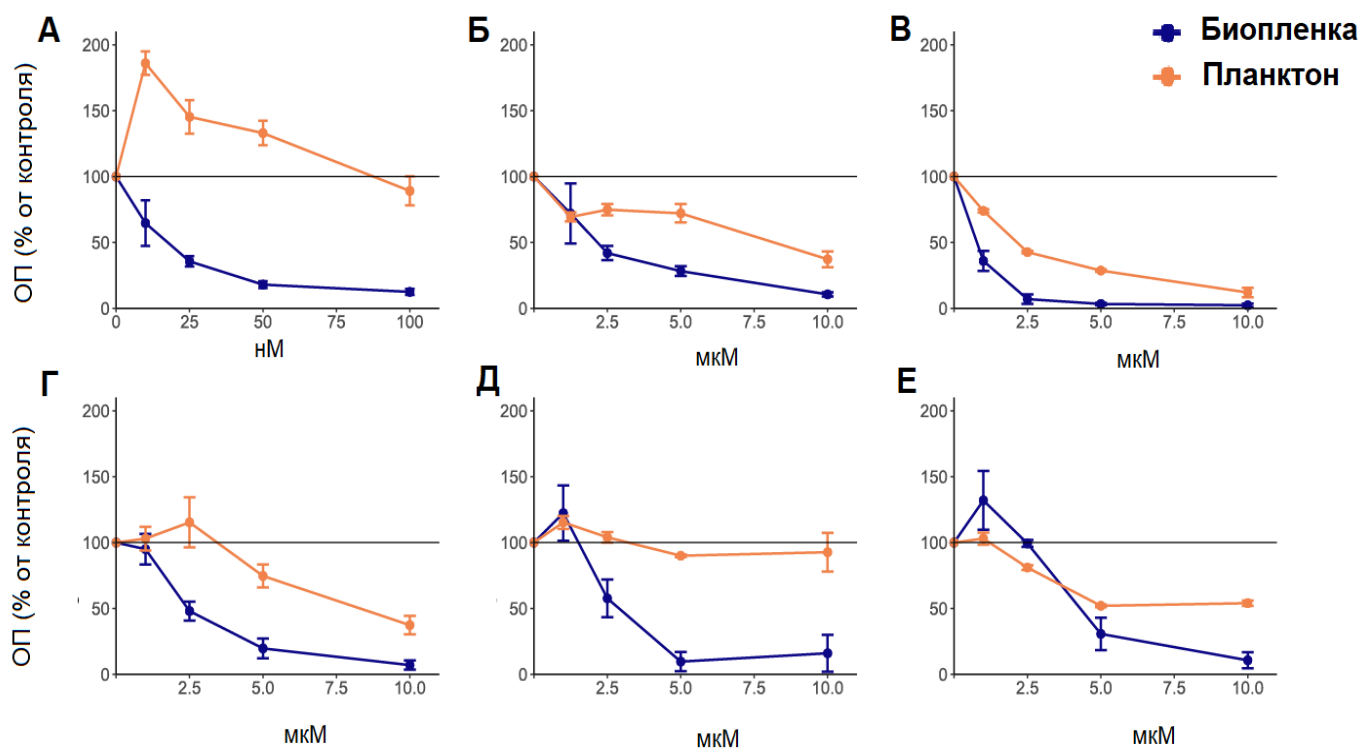


**Рисунок 18** — Рост биопленок и планктонных культур при воздействии 10 мкМ соединений из библиотеки PCL для *E. coli* W3110. Выделены соединения-кандидаты. Обозначения соединений приведены в табл.3.

По его итогам отобрали 6 перспективных кандидатов (рис. 18, табл. 3) с наиболее выраженным эффектом на рост биопленок в сравнении с действием на планктонную культуру. Отобранные соединения были протестированы дополнительно в диапазоне 2-кратных разведений (рис. 19.). Биопленки выращивали на иммунологических планшетах и окрашивали КФ.

Таблица 3 — Избранные антибиопленочные соединения, краткие свойства.

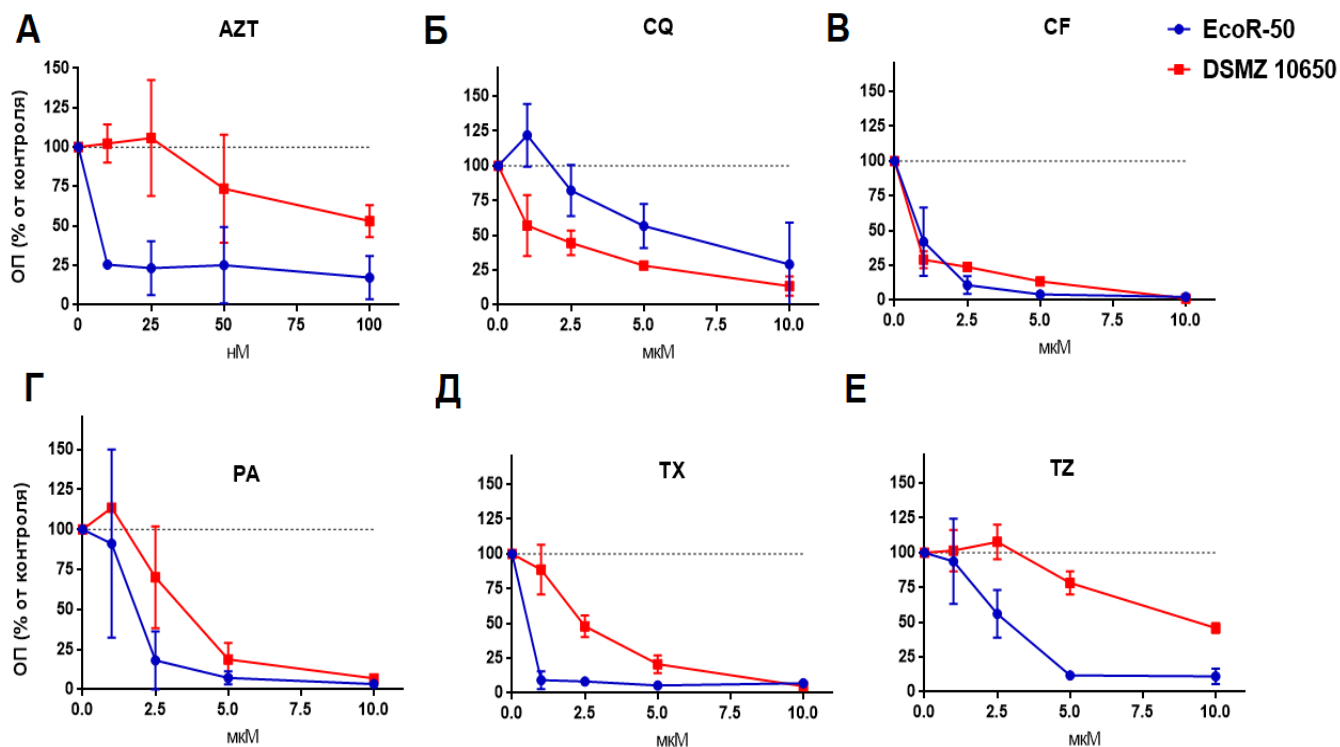
Соединение	Класс	Механизм действия	Планктонная культура (% от контроля)	Биопленки, (% от контроля)
<b>Тилоксапол (TX)</b>	Алкиларл-полиэфир спиртового типа. Муколитик, сурфактант, биоцид	Снижает поверхностное натяжение слизи	93±2	16±6
<b>Бромид тонзония (TZ)</b>	Терпеноидный спирт, сурфактант	Поверхностно-активное соединение	54±15	11±14
<b>Клиохинол (CQ)</b>	Относится к группе хинолонов. Биоцид широкого спектра действия	Хелатор	37±6	11±2
<b>Пипемидовая кислота (PA)</b>	Относится к группе хинолонов. Антибактериальный биоцид	Ингибитор гиразы	34±7	9±4
<b>Цефуроксима натрия соль (CF)</b>	Антибиотик группы цефалоспоринов	Ингибитор синтеза клеточной стенки	32±4	6±1
<b>Азидотимидин (зидовудин, AZT)</b>	Производное тимидина. Противовирусный препарат	Ингибитор обратной транскриптазы	22±0.5	16±5



**Рисунок 19** — Действие на рост планктонных культур и биопленок *E. coli* W3110 азидотимидина (А), клиохинола (Б), цефуроксима (В), пипемидовой кислоты (Г), тилоксапола (Д), тонзония бромида (Е).

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 и 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.

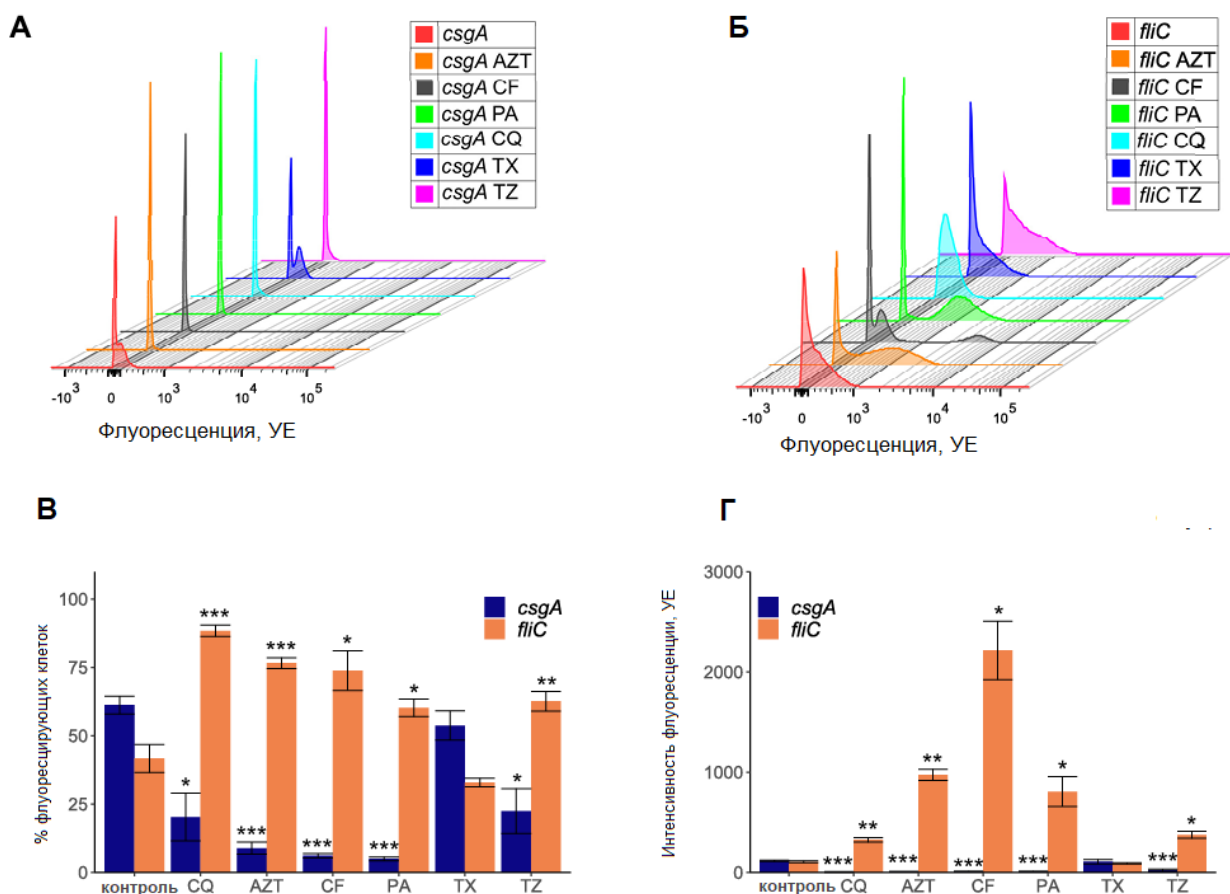
Бактерицидные препараты, а также AZT, были протестированы на рост биопленок двух уропатогенных штаммов. Результаты приведены на рис. 20.



**Рисунок 20** — Действие азидотимидина (А), клиохинола (Б), цефуроксима (В), пипемидовой кислоты (Г), тилоксапола (Д), тонзония бромид (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 тестируемым соединениям, кроме клиохинола, который более активен в отношении штамма DSMZ 10650 (ИД<sub>50</sub> порядка 1.5  $\mu\text{M}$ ). 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  $\mu\text{M}$ , а для DSMZ 10650 – 10  $\mu\text{M}$ .

Для исследования механизма действия были сконструированы репортерные штаммы (см. табл. 2) для генов *fliC* (кодирует структурный белок жгутика), и *csgA* (кодирует структурный белок фибриллы курли). Использовали готовые плазмиды на основе вектора pTc99A 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 (см. §2.4.6) по усредненным значениям интенсивности флуоресценции (в условных единицах). Результаты приведены на рис. 21.

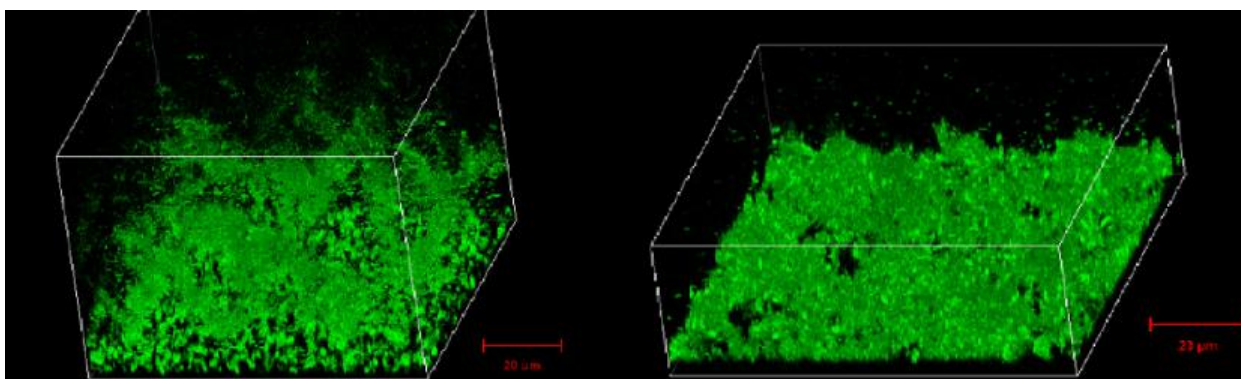


**Рисунок 21** —(А, Б). Активность промоторов *csgA* (А) и *fliC* (Б) (в условных единицах) GFP для репортерных штаммов *E. coli* W3110 при воздействии исследуемых соединений (CQ, AZT, CF, PA), определенная при помощи проточной цитометрии. В – доля флуоресцирующих клеток (% от контроля), Г – интенсивность флуоресценции для обоих репортеров при воздействии исследуемых соединений. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , тест Манна-Уитни.

Экспрессия *fliC* и *csgA* имеет выраженный бимодальный характер (рис. 21 А,Б) во всех случаях. Это связано как с упомянутой выше сложной, многоступенчатой регуляцией экспрессии «жгутиковых генов» и «генов курли», так и с гетерогенностью микробной популяции в биопленке (Besharova et al., 2016). Из всех исследуемых соединений только TX 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 матрикса. Остальные соединения заметно снижают как процент флуоресцирующих клеток, так и интенсивность флуоресценции для репортера *PcsgA-egfp* (рис. 21 В,Г.), и, наоборот, увеличивают эти показатели для репортера *PfliC-egfp*. По литературным данным, бромид тонзония имеет структурное сходство с терпеноидным спиртом фарнезолом, который нарушает проницаемость клеточных мембран (Inoue et al., 2004; Rowat et al., 2005). Недавнее

исследование показало его возможное применение в качестве антибиопленочного агента в иммобилизованном виде на наночастицах (Sims et al., 2018).

Остальные соединения воздействуют именно на биосинтез матрикса (как показывают данные для репортера *P<sub>csgA</sub>-egfp*). Стимуляция активности *fliC*-промотора говорит о том, что они могут стимулировать дисперсию биопленки или способствовать переходу клеток к планктонному фенотипу, «сдвигая равновесие» в сложных регуляторных путях. Данное предположение подтверждают также данные КЛСМ для штамма *E. coli* W3110 pVM42, кодирующего зеленый флуоресцирующий белок (GFP). Биопленки выращивали в 8-луночных планшетах, как описано в главе 2. 3. 6, при воздействии 10 мкМ клиохинола. Биопленка при воздействии 10 мкМ CQ имеет вид плоского слоя, трехмерная структура не выражена. Результаты приведены на Рис. 22.



**Рисунок 22** — КЛСМ биопленок *E. coli* W3110 pVM42. Слева – контроль, справа – 10 мкМ CQ. Шкала – 20 мкм.

С целью более детального изучения механизма действия азидотимидина, клиохинола, цефуросима и пипемидовой кислоты был проведен протеомный анализ (см. § 2.4.8). AZT брали в концентрации 0.1 мкМ, РА – 10 мкМ, CF – 2.5 мкМ, CQ – 1 мкМ. Количество белка оценивали безметковым методом (label-free quantitation, LFQ), для каждого белка суммировались интенсивности сигналов всех пептидов (при количестве >2). Наиболее и наименее отличные белки представлены в табл. 4 и табл. 5

Таблица 4 — Набор белков, значимо отличающихся от контроля при воздействии AZT и CF.

AZT			CF		
Белок	log <sub>2</sub> (опыт/контроль)	Краткое описание	Белок	log <sub>2</sub> (опыт/контроль)	Краткое описание
YebG	9.11	Трансляция индуцируется при повреждении ДНК	TatE	3.92	Сес-независимая транслоказа
MdtE	5.53	Белок множественной лекарственной устойчивости	AmpH	3.48	D-аланил-D-аланин-карбоксипептидаза/эндопептидаза
HdeD	4.81	Мембрансвязанный белок кислотоустойчивости	FimH	3.15	Адгезин
FrlB	4.37	Фруктозолизин 6-фосфат дегликаза	YcfS	2.89	Вероятная L,D-транспептидаза
RecD	4.19	Субъединица фермента RecBCD	DnaT	2.80	Компонент праймосомы
GadA	3.89	Альфа-глутамат декарбоксилаза	FimD	2.79	Белок ашер наружной мембраны
DinI	3.74	Иницируется повреждением ДНК	FtsL	2.77	Участвует в сокращении Z-кольца при делении клетки
TdcC	3.70	Треонин/сериновый транспортер	FtsI	2.54	Синтез пептидогликана
RmuC	3.61	Участвует в рекомбинации ДНК	YgaC	2.45	Индуктируется кислотным стрессомС
PaaZ	3.28	Окспепин-КоА гидролаза/3-оксо-5,6-дегидросуберил-КоА семиальдегид дегидрогеназа PaaZ	FtsB	2.29	Деление клетки
DgcJ	-3.34	Предполагаемая дигуанилат циклаза YeaJ	ShiA	2.09	Транспортер шикимата
PhoA	-3.58	Щелочная фосфатаза PhoA	CspD	2.05	Белок холодового шока
HisQ	-3.74	Пермеаза, транспорт гистидина	PliG	-2.17	Ингибитор лизоцима g-типа
CsgA	-3.90	Большая субъединица курли	YehD	-2.28	Неизвестный пилеподобный белок
YccT	-3.98	Функции неизвестны	Sbp	-2.84	Сульфат-связывающий белок
YedE	-4.06	Мембран-связанный белок	CsgB	-3.34	Малая субъединица курли
CsgC	-4.90	Биосинтез курли			
FryB	-4.90	Компонет транспортной системы PTS			
NlpC	-5.30	Вероятная эндопептидаза			
CsgB	-6.93	Малая субъединица курли			



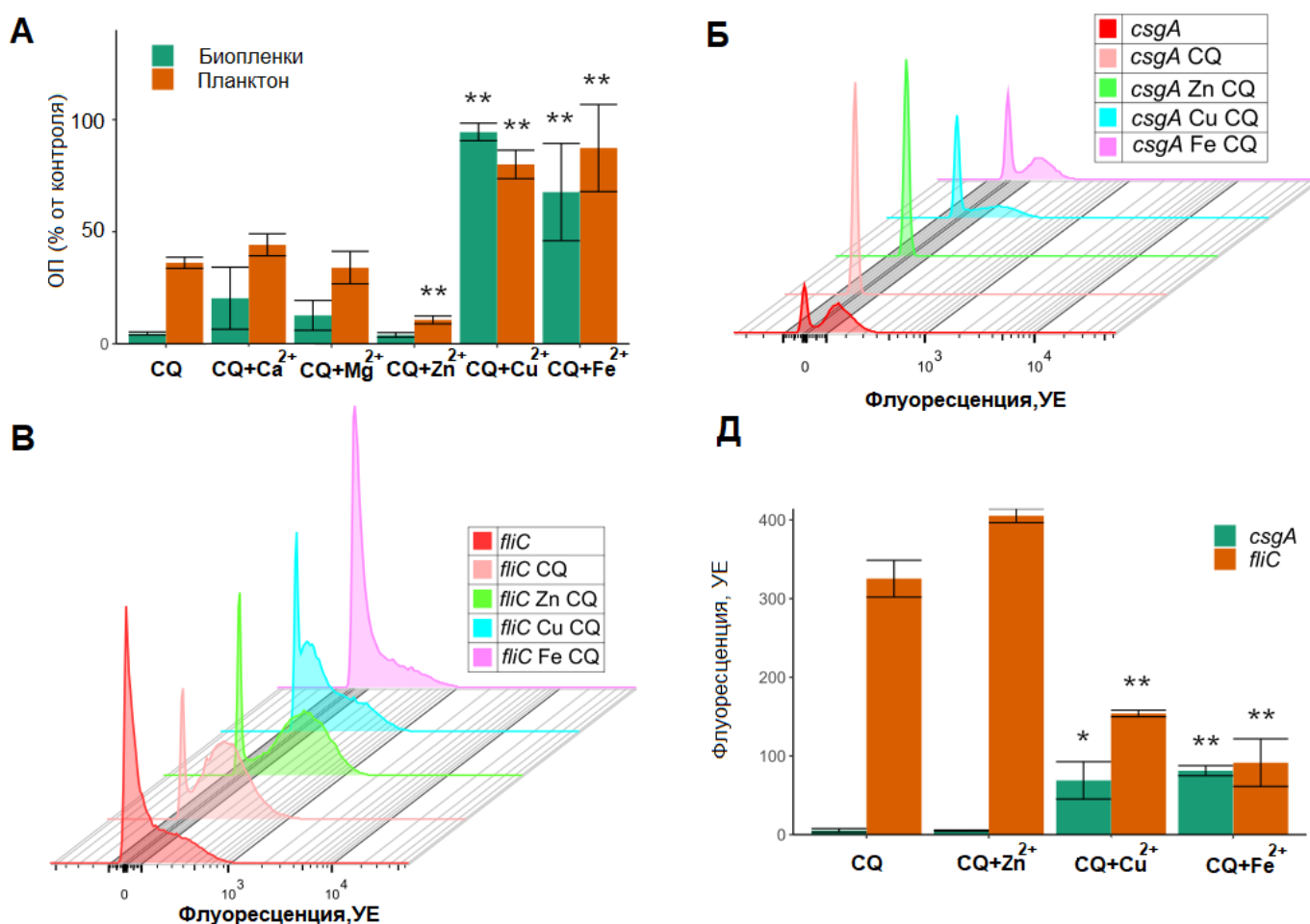
**Таблица 5** — Набор белков, значимо отличающихся от контроля при воздействии PA и CQ.

PA			CQ		
Белок	Кратное изменение	Краткое описание	Белок	Кратное изменение	Краткое описание
YebG	11.15	Трансляция индуцируется при повреждении ДНК	NhaB	5.18	Na(+)/H(+) антипортер
MdtE	5.80	Белок множественной лекарственной устойчивости	CcmF	4.20	Биогенезис цитохрома с-типа
TdcC	5.63	Треонин/сериновый транспортер	ZntA	3.48	Транспортная АТФаза для свинца, кадмия, цинка
TdcD	5.63	Пропионат киназа	Syd	3.48	Компонент Sec-системы
CadC	5.56	Фактор транскрипции	YbgA	3.11	Функции неизвестны
FrlB	5.42	Фруктозелизин-6-фосфат дегликаза	MotB	3.03	Статор жгутикового аппарата
RecN	5.12	Репарация ДНК	FeoC	2.90	Транспорт Fe II
CroE	5.06	Вероятный регулятор транскрипции лямбдовидного профага $\epsilon 14$	YdcV	2.72	Транспортная пермеаза ABC-типа
DctR	5.04	НТН-подобный регулятор транскрипции	TatE	2.61	Sec-независимая транслоказа
FdhF	5.01	Формиат-дегидрогеназа H	EntD	2.14	Компонент энтеробактин-синтазы
CsgA	-3.83	Большая субъединица курли	HiuH	-1.15	5-гидроксиизоурат гидролаза
ClsC	-4.05	Кардиолипин синтаза C	TomB	-1.30	Регулятор образования биопленок. Компонент системы токсин-антитоксин.
YibI	-4.06	Функция неизвестная	HybO	-1.37	Малая субъединица гидрогеназы-2
HolB	-4.19	$\delta$ -субъединица ДНК полимеразы III	HybA	-1.40	Субъединица гидрогеназы-2
FryB	-4.20	Компонент транспортной системы PTS	TopB	-1.54	ДНК- топоизомераза 3
HisQ	-4.24	Пермеаза, транспорт гистидина	LeuD	-1.63	Малая субъединица 3-изопропилмалат дегидратазы
CsgC	-4.86	Биосинтез курли	YcaK	-2.08	Неизвестная NAD(P)H оксидоредуктаза
YacC	-5.26	Вероятный липопротеин	PreT	-3.11	Субъединица NAD-зависимой дигидропиримидин-дегидрогеназы
YbiO	-5.43	Механочувствительный трансмембранный канал	YejF	-5.98	Неизвестный ABC-транспортер
McbR	-6.81	Регулятор транскрипции НТН-типа	RfaQ	-6.00	Гептозил-трансфераза корового липополисахарида

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 PA, говорит об альтернативных механизмах ингибирования биосинтеза курли. 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.

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. Значительно падает содержание белков, содержащих в качестве кофакторов бивалентные катионы ионы, в частности ДНК-топоизомеразы 3 (табл. 5). Предполагается, 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. 23



**Рисунок 23** — 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 репортеров 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.

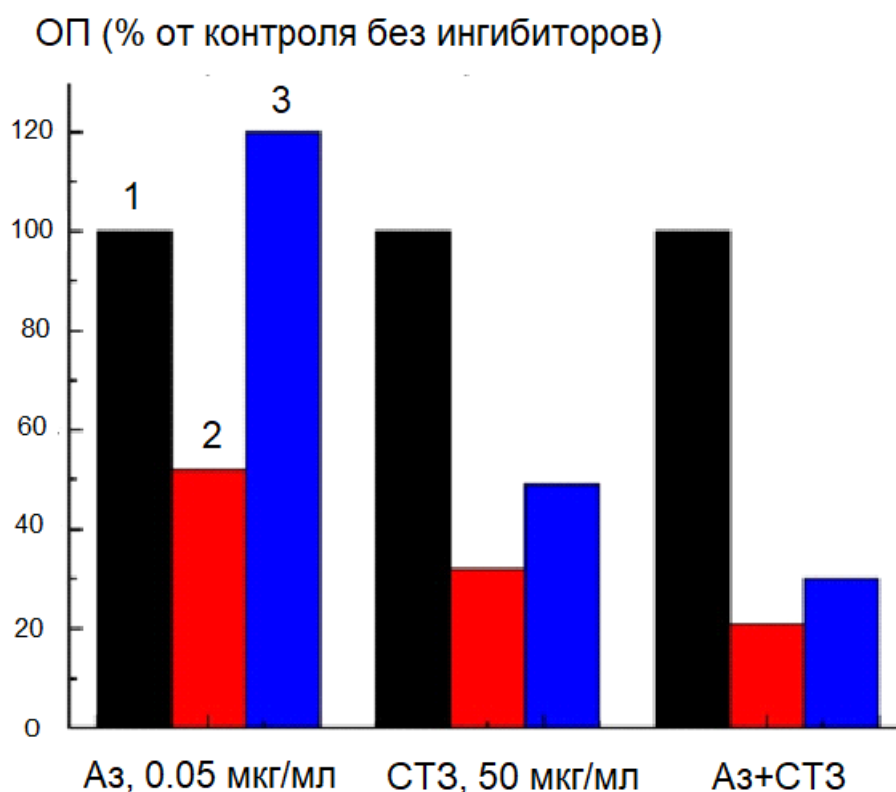
Рост планктонных культур и биопленок не меняется при добавлении катионов Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, однако значительно возрастает при добавлении Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, что может свидетельствовать о снятии ингибиторного эффекта. По литературным данным (Wang et al., 2010), сродство CQ к бивалентным катионам цинка, меди, и железа выше, чем к катионам магния и кальция. По этой причине первые на оказывали заметного эффекта на рост биопленок. Добавление катионов цинка, напротив, усиливает ингибиторный эффект в отношении планктонных культур, и не влияет на рост биопленок. Стимуляция клиохинолом экспрессии «жгутикового» гена *fliC* CQ и ингибирование *csgA* значительно снижается при добавлении Fe<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup>, но не меняется при добавлении Zn<sup>2+</sup>.

Таким образом, нами впервые показан сильный антибиопленочный эффект 6 избранных соединений против 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 подавляют рост и созревание биопленок. Методом проточной цитометрии при помощи флуоресцирующих репортеров удалось показать воздействие на регуляторный каскад генов курли (*csgA*) и жгутиков (*fliC*). При помощи протеомики для AZT, PA, CF и CQ показано, что в основе антибиопленочного эффекта лежат разные типы стрессовых ответов. В частности, для клиохинола данный эффект связан с его хелатирующими свойствами.

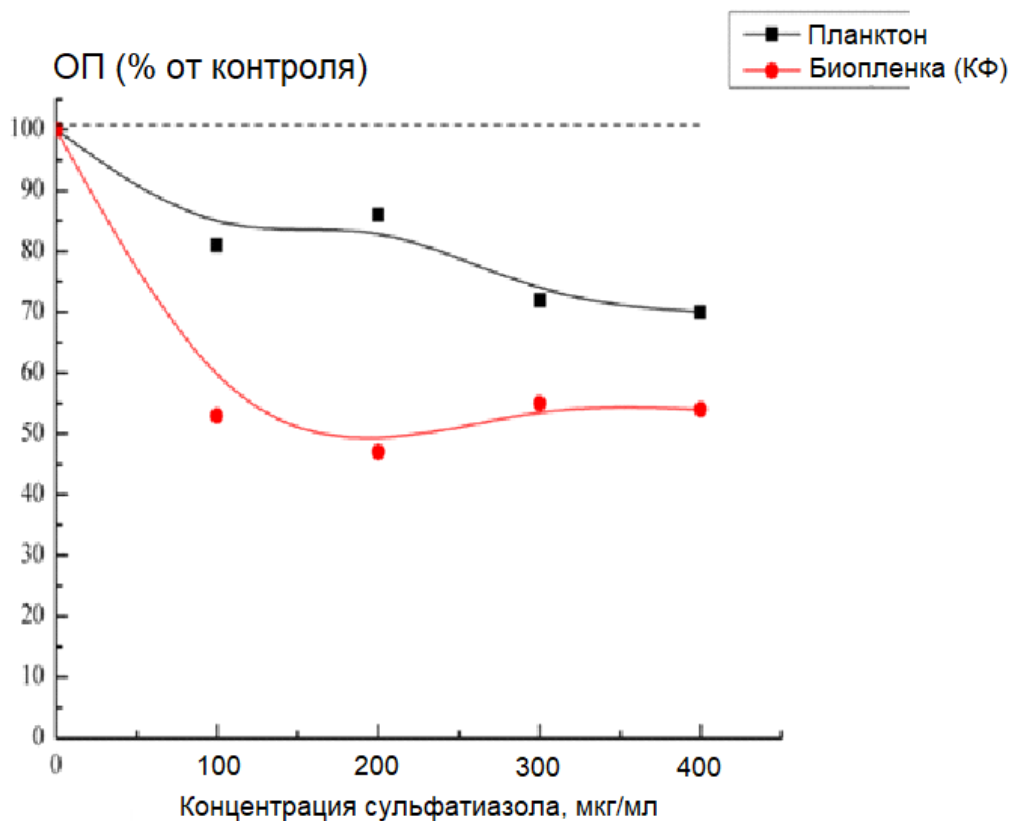
### 3.1.4. Антибиопленочный эффект сульфатиазола в сочетании с азитромицином

Сульфатиазол – один из наиболее известных представителей сульфаниламидов – традиционных биоцидов, применяемых с середины XX века. Высказано предположение об ингибировании им бактериальных ц-ди-ГМФ-зависимых систем (Antoniani et al., 2010). Мы исследовали возможность применения этого соединения против биопленок в сочетании с азитромицином на примере *K. rhizophila* DC2201 и *P. chlororaphis* 449.



**Рисунок 24** — Совместное действие азитромицина, Аз (0.05 мкг/мл) и сульфатиазола, СТЗ (50 мкг/мл) на рост планктонной культуры (2) и биопленки (3) *K. rhizophila* DC2201. Окрашивание КФ. Данные представлены в % от контроля (1) без ингибиторов.

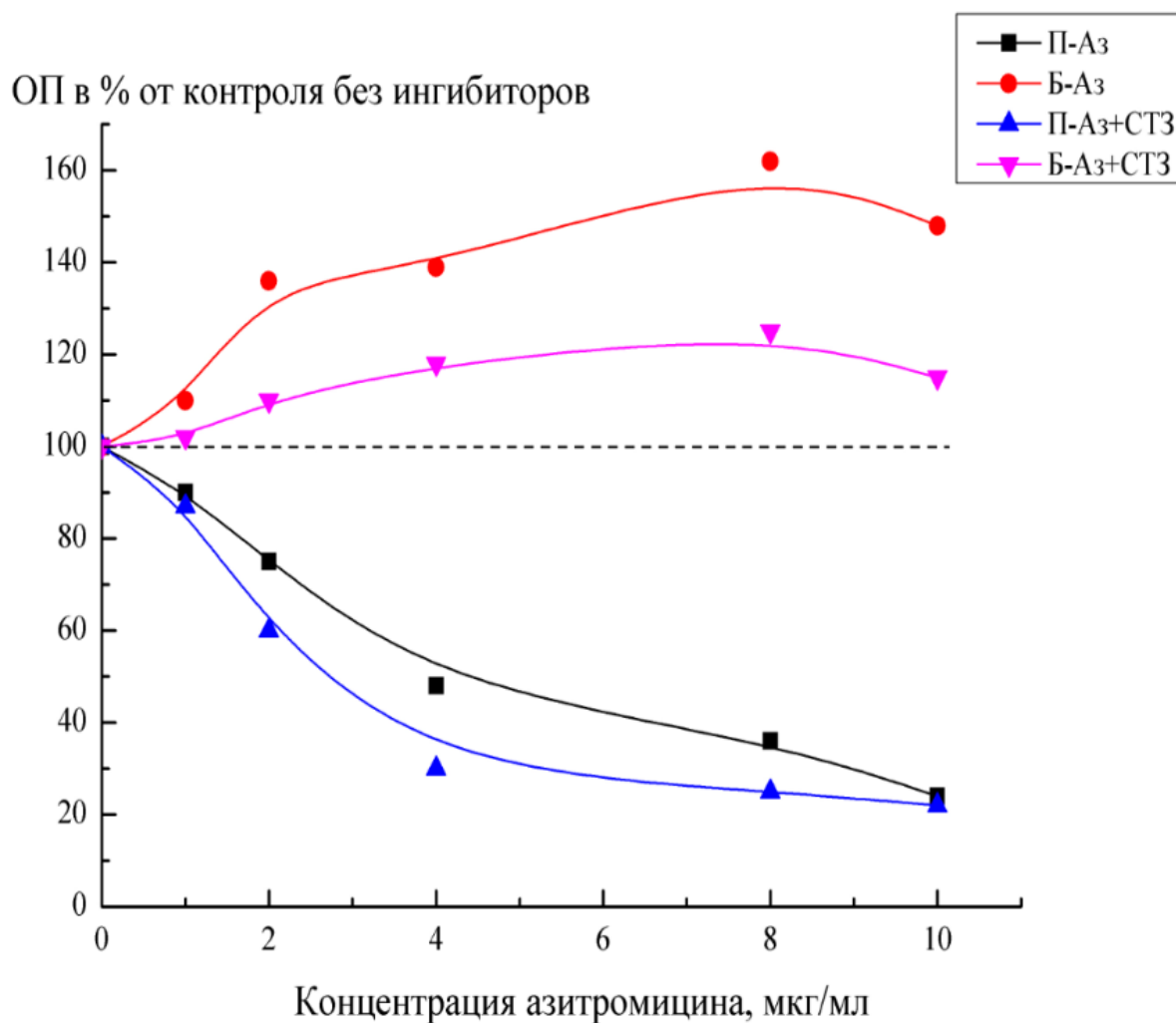
*K. rhizophila* DC2201. Для данного микроорганизма удалось обнаружить слабый аддитивный ингибиторный эффект азитромицина и сульфатазиола в отношении планктонной культуры и биопленок (рис. 24). Биопленка *K. rhizophila* DC2201 гораздо более устойчива к его ингибиторному действию. Тем не менее, сульфатазиол способен снимать эффект нежелательной стимуляции роста биопленки, вызванной сверхнизкими концентрациями азитромицина.



**Рисунок 25** — Действие сульфатазиола (300 мкг/мл) на рост планктонных (П) культур и биопленок (Б) *P. chlororaphis* 449. Биопленки окрашены КФ.

Биопленки *P. chlororaphis* 449 оказались гораздо более чувствительными к действию сульфатазиола, несмотря на гораздо большую устойчивость планктонной культуры к СТЗ (рис.25). Стимуляция роста биопленок низкими концентрациями азитромицина уменьшается для данного микроорганизма при сочетании с 300 мкг/мл СТЗ (рис. 26).

Таким образом, сульфатазиол обладает заметным антибиопленочным эффектом в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Синергидного эффекта в сочетании с антибиотиком не наблюдается, однако данный агент может быть использован в составе комбинированных препаратов для предотвращения нежелательного стимулирования роста биопленок при химиотерапии антибиотиками.



**Рисунок 26** — Совместное действие азитромицина (Аз) и сульфатаиазола (СТЗ, 300 мкг/мл) на рост планктонных культур (П) и биопленок (Б) *P. chlororaphis* 449. Биопленки окрашены КФ.

### 3.2 Действие пробиопленочных агентов

В данном разделе рассмотрен стимулирующий эффект никлозамида и диметилсульфоксида (ДМСО) на синтез биологически активных веществ – феназинов и виолацеина в биопленках и планктонной культуре *P. aeruginosa* PAO1 и хромобактерий, соответственно.

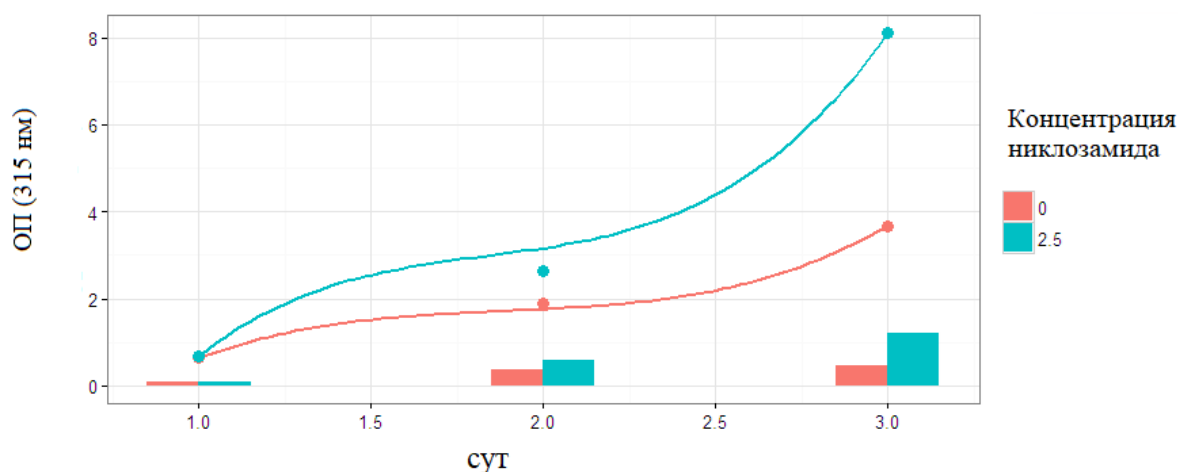
#### 3.2.2 Стимуляция синтеза феназинов никлозамидом в биопленках *P. aeruginosa* PAO1

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).

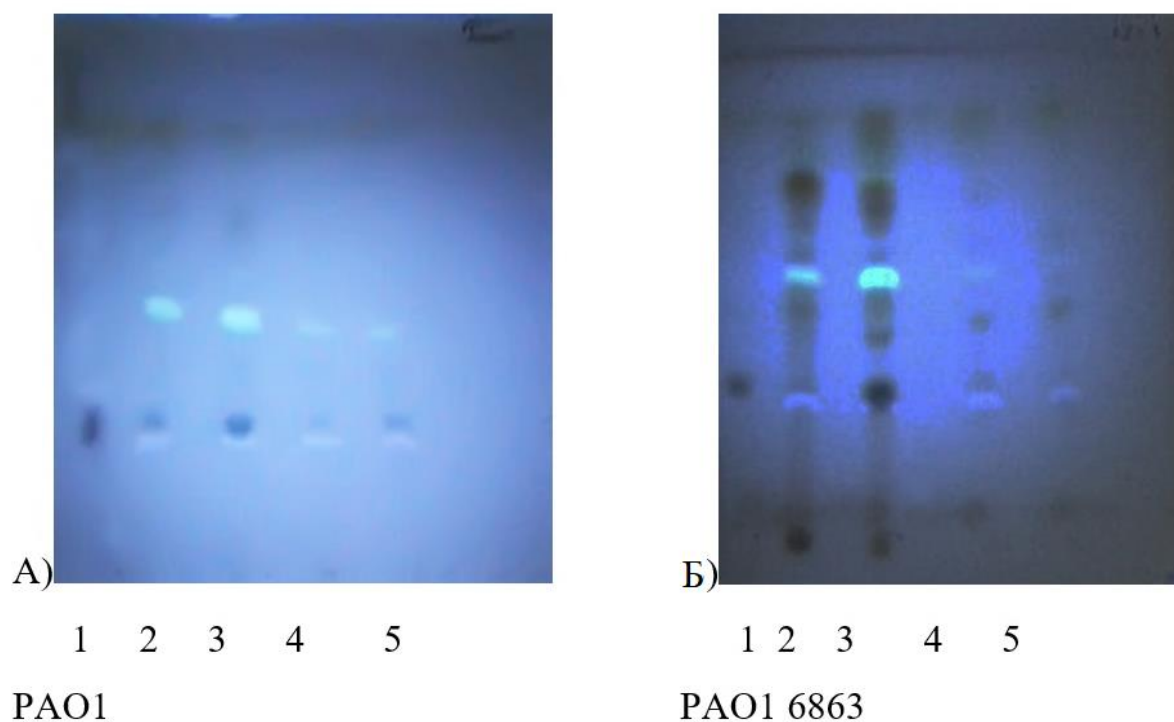
Кроме того, пиоцианин вызывает апоптоз нейтрофилов (Prince et al., 2008). Для некоторых феназинов также показана противоопухолевая активность (Guttenberger et al., 2017).

На первом этапе измеряли динамику роста биопленок для исходного штамма PAO1 в равновесии с планктонной культурой. 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. Интересен тот факт, что у штамма PAO1 6863 состав пигментов отличается от штамма дикого типа, как можно судить о различной окраске супернатантов (сине-зеленый у мутанта, желтый у штамма дикого типа) при равной оптической плотности. Это позволяет сделать предположение о разном пигментном составе супернатантов этих двух штаммов. Особенно заметно увеличение продукции штаммом дикого типа PAO1, у которого увеличивается как общий синтез феназинов, так и продуктивность штамма в расчете на количество жизнеспособных клеток.

При помощи тонкослойной хроматограммы было изучено изменение состава феназинов для планктонных культур дикого штамма и мутанта (рис. 27). Как и ожидалось, мутантный штамм имеет другой набор пигментов. Также 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.



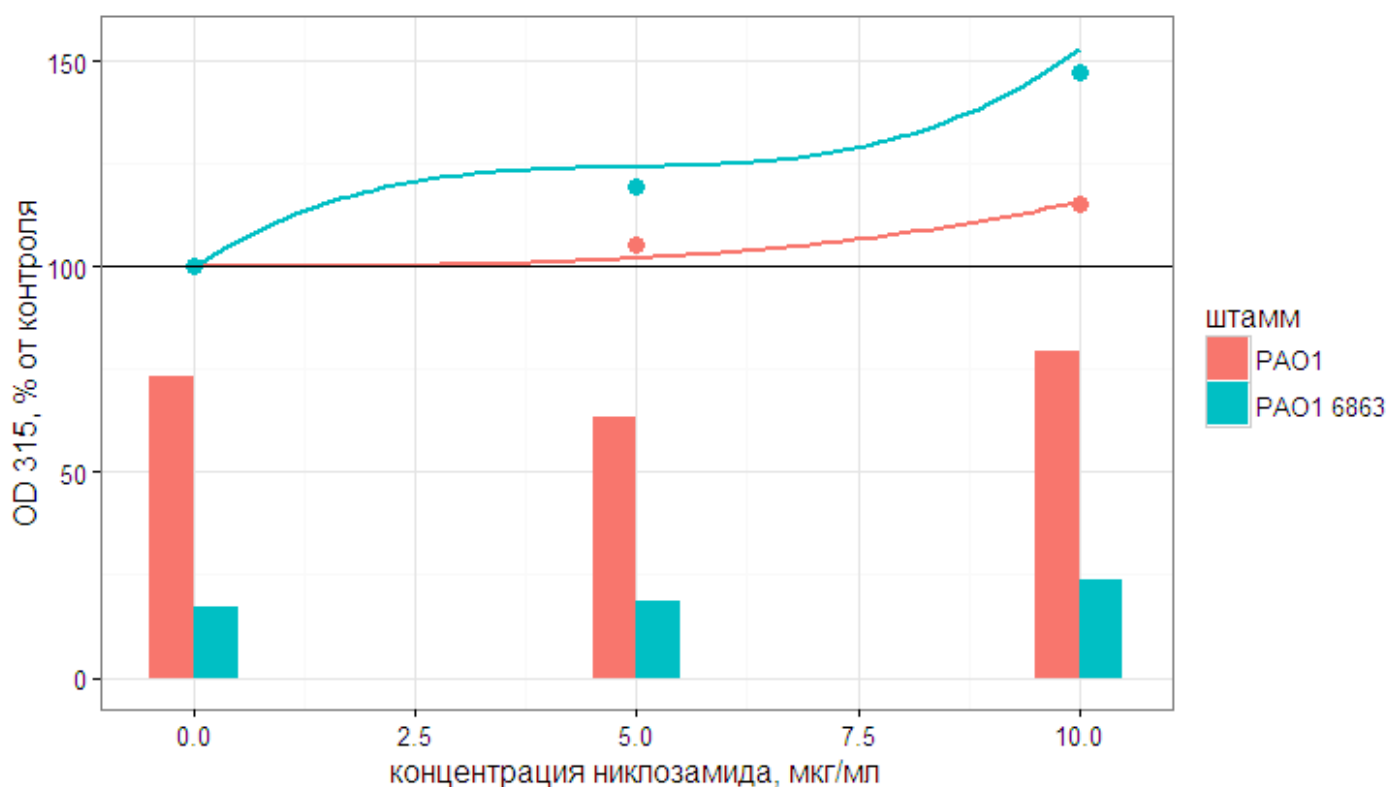
**Рисунок 27** — Динамика образования феназинов планктонной культурой штамма *P. aeruginosa* PAO1. Красной линией показаны контрольные значения, синей — полученные при добавлении 2.5 мкг/мл никлозамида. Столбцами обозначена продуктивность.



**Рисунок 28** — Хроматограмма феназинов, полученная в системе хлороформ: метанол 9:1 для штамма PAO1 (А), и PAO1 6863 (Б). Снимки сделаны в ультрафиолетовом (360 нм) свете. 1. Свидетель – пиоцианин. Хлороформный экстракт исходный (2 – контроль; 3 – в присутствии никлотиновой кислоты); хлороформный экстракт после перевода в кислотный раствор (4 – контроль; 5 – в присутствии никлотиновой кислоты).

В то же время никлотиновая кислота 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 quorum sensing (рис. 29).





**Рисунок 29** — Зависимость образования феназинов биопленками штаммов *P. aeruginosa* от концентрации никлозамида. По оси Y отложены проценты от контроля. Столбцами показана продуктивность, умноженная на 50. Биопленки выращивали на фильтрах из стекловолокна.

Таким образом, никлозамид в диапазоне концентраций до 10 мкг/мл способен стимулировать синтез феназинов в планктонных культурах как штамма дикого типа, так и дефектного по системе QS мутанта через синтез PCA. Продукция феназинов штаммом 6863 значительно возрастает в биопленках при воздействии никлозамида. Эти данные говорят о сложном, непрямом механизме интерференции никлозамида с бактериальной системой quorum sensing, а также имеют очень важное значение для биотехнологии производства феназинов, находящих широкое практическое применение.

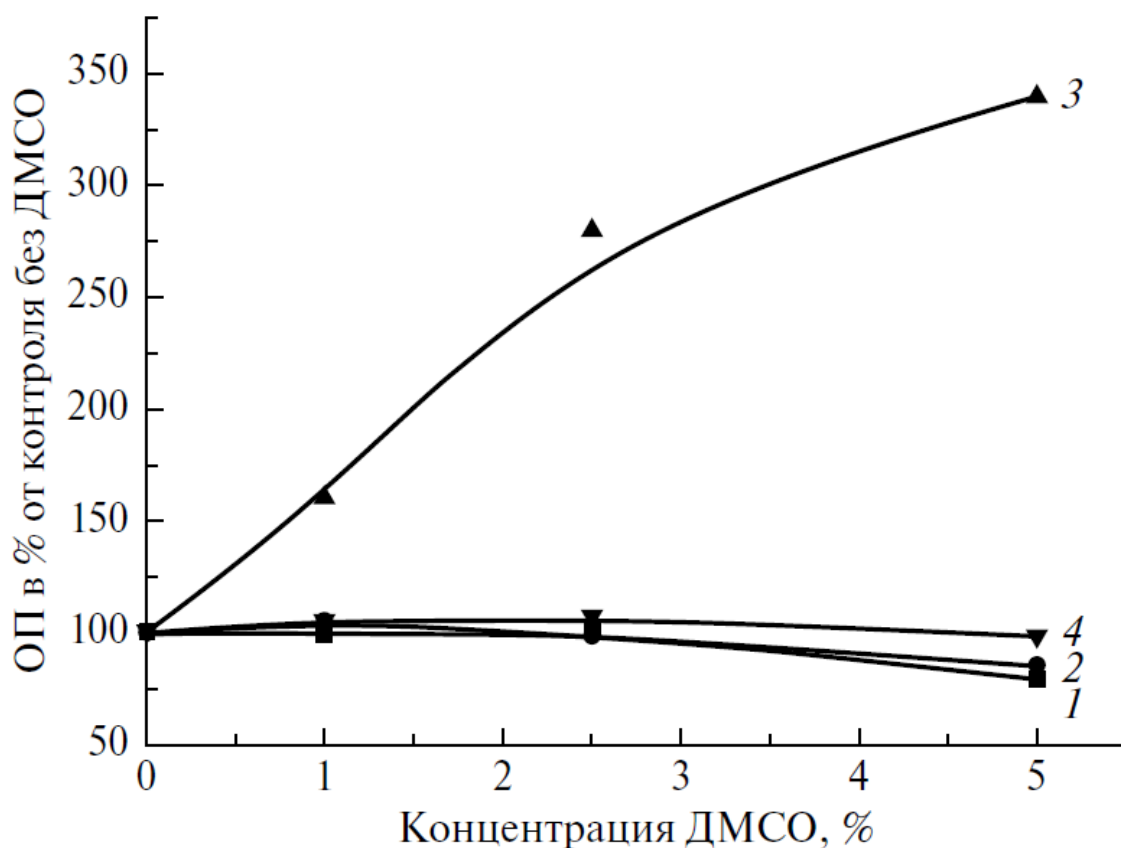
### 3.2.3 Влияние ДМСО на биосинтез виолацеина в биопленках *Chromobacterium violaceum*

Виолацеин впервые описан в 1882 г, а позднее получен в кристаллическом состоянии (Strong, 1944). В это же время были открыты его антимикробные свойства. Виолацеин подавляет рост некоторых грибов (Sasidhara et al., 2015), малярийных плазмодиев (Lopes et al., 2009), а также лейшманий (Leon et al., 2001). В последнее время находит практическое применение и его антиопухолевая активность (Alshatwi et al., 2016).

Было показано «увеличение синтеза виолацеина в биопленках, выращенных как при наличии равновесия с планктонной культурой (в опытах с тefлоновыми кубиками и

планшетами), так и при отсутствии такого равновесия (в опытах с биопленками-колониями на фильтрах из стекловолокна). В биопленках мутантного штамма CV026 в этих условиях биосинтез виолацеина не наблюдается» (Мартьянов с соавт., 2018).

Как показано на рис. 30. ДМСО способен стимулировать синтез виолацеина только в биопленках штамма дикого типа WT в диапазоне концентраций, не токсичных для данного микроорганизма (до 5%).

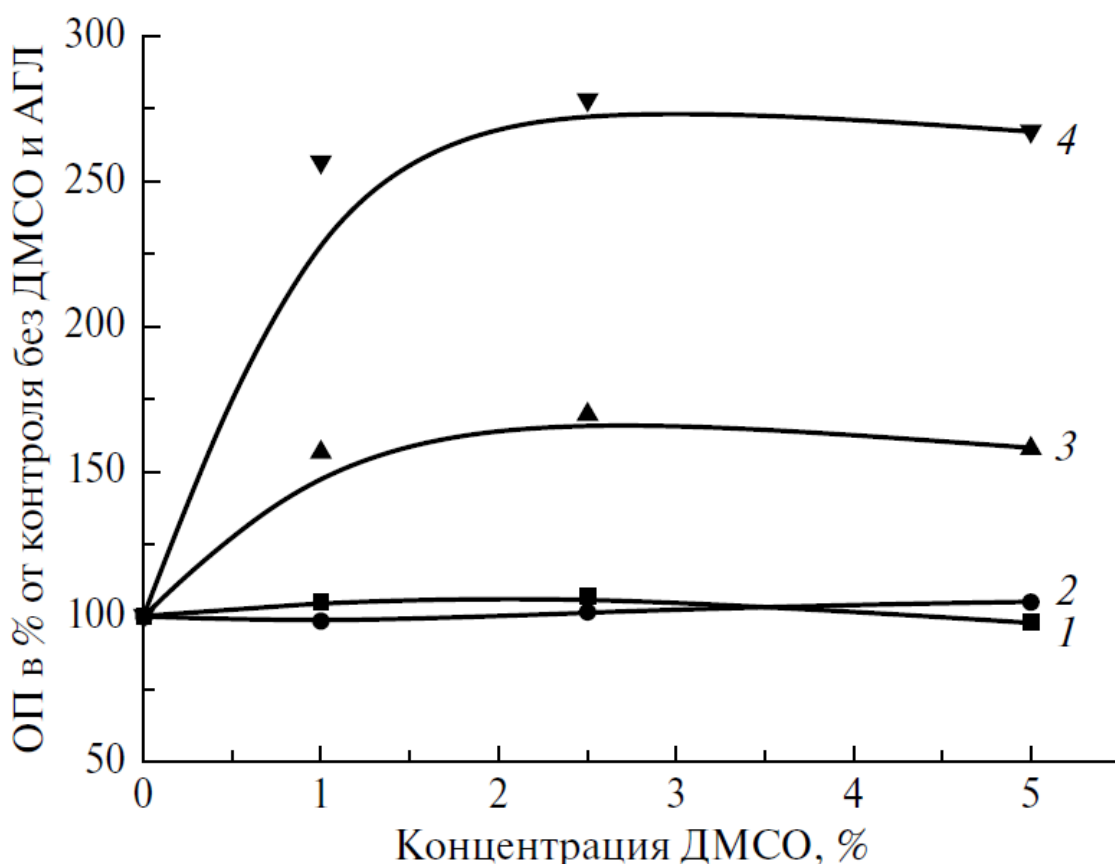


**Рисунок 30** — Действие ДМСО на биосинтез виолацеина планктонными культурами (1, 2) и биопленками (3, 4) штамма *S. violaceum* WT (1, 3) и мутанта CV026(2, 4). ОП экстрактов измерена при 590 нм. Биопленки выращены на тefлоновых кубиках.

«Эксперименты в других системах формирования биопленок показали, что максимальное образование виолацеина в биопленках, выращенных на фильтрах из стекловолокна, достигается при 2- 2.5% ДМСО в питательной среде. При этом содержание виолацеина превышает контрольную величину примерно в 2 раза. В биопленках, выращенных в лунках планшетов, образование виолацеина под воздействием 3% ДМСО превышает контрольные величины почти в 4 раза. Таким образом, выраженное стимулирующее воздействие ДМСО на биосинтез виолацеина в биопленках *S. violaceum* ATCC 31532 наблюдается независимо от способа получения биопленок» (Мартьянов с

соавт., 2018). При этом процесс сопровождается ростом метаболически активных клеток в биопленке.

На этом и последующих рисунках пунктирной прямой показан уровень контроля. Для выяснения возможной связи стимулирующего воздействия ДМСО на биосинтез виолацеина с системой QS мы использовали биосенсорный мутант *C. violaceum* CV026. Оказалось, что ДМСО вызывает синтез виолацеина в планктонной культуре *C. violaceum* CV026 только при одновременном присутствии низких концентраций С6-АГЛ, не индуцирующих синтез виолацеина (рис. 31).



**Рисунок 31** — Зависимость стимулирующего влияния ДМСО на биосинтез виолацеина планктонными культурами мутанта *C. violaceum* CV026 от присутствия в среде С6-АГЛ (1 – 0; 2 – 0.01; 3 – 0.1; 4 – 1 мкг/мл). ОП экстрактов измерена при 590 нм.

Таким образом, ДМСО в диапазоне концентраций от 1.5 до 5% индуцирует синтез виолацеина в биопленках хромобактерий. Несмотря на то, что данный индуктор не может играть роль аналога АГЛ, возможно косвенное его воздействие на систему quorum sensing. При этом нельзя исключать и альтернативных механизмов стимуляции синтеза виолацеина, которые требуют дальнейшего исследования. Эти данные могут иметь большое практическое значение для полупромышленного синтеза, который в настоящий момент ведется более традиционными способами.

## ГЛАВА 4. 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. Согласно постановлению экспертного комитета ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) в 1998 г, а также Научного комитета по продуктам питания (Scientific Committee on Food, SCF) в 2003 г, безопасной для человека была признана концентрация 1 мг/ кг (JECFA) и 2 мг/кг массы продукта (SCF). 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 (El-Registan et al., 2006; Kemme, Heinzl-Wieland, 2018). В данной части работы подробно изучена активность 4-ГР в качестве возможного антибиопленочного агента, как самого по себе, так и в сочетании с азитромицином. Нами на широком круге бактерий показана стимуляция роста микробных биопленок при суббактериостатических концентрациях этого антибиотика. Поэтому особый интерес представляла возможность использовать 4-ГР для снятия такого эффекта. Кроме того, согласно полученным нами результатам, 4-ГР в диапазоне концентраций, нетоксичных для человека, обладает выраженным антимикробным действием, а главное – значительно увеличивает чувствительность тестируемых грамположительных бактерий к азитромицину. Как показывает окрашивание специфическим для кислых полисахаридов красителем DMMB для 4-ГР главной мишенью являются пути биосинтеза углеводных компонентов матрикса. Детальные механизмы действия 4-ГР требуют дальнейшего изучения. Вероятно в их основе лежит как подавление роста планктонных бактерий, так и задержка формирования зрелой биопленки. 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. Можно предположить, что 4-ГР не играет роль аналога АГЛ и воздействует на другие метаболические пути, связанные с формированием биопленок. Для объяснения данного механизма требуются дальнейшие исследования.

По аналогии с 4-ГР как широко применяемым продуктом было изучение салициланилидного препарата никлозамида (2',5-дихлоро-4'-нитросалициланилида) как перспективного модулятора роста биопленок. Первой задачей было изучение влияния никлозамида на бактериальную систему quorum sensing модельных штаммов *C. violaceum* и *P. aeruginosa*. Исследования антикворумной активности в отношении мутантного штамма CV026, показало отсутствие избирательного подавления системы quorum sensing. Схожая картина получена для двух штаммов *P. aeruginosa* PAO1: мутантный штамм pME6863, неспособный к синтезу АГЛ, оказался более устойчивым, хотя стимуляции роста биопленок никлозамидом у псевдомонад практически отсутствует. Вместе с тем нами была показана стимуляция никлозамидом продукции феназинов, в частности пиоцианина, в значительной большей степени у мутантного штамма. Методом тонкослойной хроматографии был показан различный состав пигментов у штамма дикого типа и мутанта, а также стимуляция у мутанта синтеза предшественника пиоцианина – PCA. Полученные данные, с одной стороны, говорят об опосредованном влиянии никлозамида на бактериальную систему quorum sensing, а с другой – о потенциальной возможности применения никлозамида в качестве пробиопленочного агента для биотехнологического синтеза феназинов.

Для сравнения проведено также изучение антибиопленочных свойств никлозамида в отношении грамположительных бактерий, а также способности данного препарата оказывать синергидный эффект совместно с антибиотиком азитромицином. Эффективное антибиопленочное действие никлозамида в отношении грамположительных бактерий, очевидно, связано с воздействием на ранние стадии формирования биопленки и может быть следствием подавления перехода планктонных бактерий к прикрепленному способу существования. Таким образом, никлозамид в диапазоне концентраций, не токсичных для человека, обладает выраженным (сравнимым с антибиотиками) бактериостатическим эффектом, а также может быть рекомендован в качестве бинарного препарата в сочетании с антибиотиком азитромицином для снятия нежелательной стимуляции роста биопленок, вызываемой субингибиторными концентрациями последнего.

Продолжением этих работ был скрининг библиотеки соединений Prestwick Chemical Library, на предмет антибиопленочной активности в отношении модельного штамма *E. coli* W3110. Данный организм является хорошей моделью для изучения биопленок, кроме того, во внеклеточном матриксе данного штамма практически отсутствуют полисахариды, что даёт возможность легко диспергировать биопленку для последующего изучения методами протеомики и проточной цитометрии (Besharova et al., 2016). 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). Основным компонентом ВПМ для штамма W3110 являются белковые нити курли. В связи с этим мы предположили, что механизм биосинтеза курли является главной мишенью для исследуемых соединений, и именно его воздействие на данный компонент вызывает столь выраженный антибиопленочный эффект. Регуляция биосинтеза жгутика находится под контролем фактора транскрипции CsgD, регулирующего транскрипцию оперона *csgBAC*, кодирующего структурные белки курли. Второй оперон, *csgDEFG*, регулируется рядом других сигма-факторов и кодирует белки транспортной системы курли и вышеупомянутый регулятор (Banhart, Chapman, 2006). CsgA является структурным белком фибриллы-курли, CsgB выполняет роль затравки, роль CsgC неизвестна. Система регуляция биосинтеза курли чрезвычайно сложна и имеет несколько уровней. Ключевую роль в переходе от планктонного фенотипа к биопленочному у *E. coli* играет фактор транскрипции  $\sigma^S$ , положительно регулирующий экспрессию CsgD при определенных условиях окружающей среды (бедная среда, температура ниже 30 °C). Для данного перехода характерно снижение уровня экспрессии жгутиковых генов и усиление экспрессии генов курли (Besharova et al., 2016). Наше предположение состояло в том, что исходные соединения способны воздействовать на этот процесс «в обратную сторону», то есть индуцировать переход от биопленочного фенотипа к планктонному. Данные, полученные методом проточной цитометрии для репортерных штаммов по промоторам генов *flic* и *csgA*, показали этот эффект для всех кандидатов, кроме тилоксапола.

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.

Данные 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 нами данным, ингибиторный эффект на биопленки CQ не снимается цинком, что соответствует ранее полученным данным, 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 нами ранее его 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.

Не менее важной группой традиционных антибиопленочных препаратов могут быть сульфаниламидные соединения. Они применяются в качестве противомикробных препаратов с середины XX века. Механизм их действия основан на нарушении синтеза фолиевой кислоты. В силу опасности возникновения резистентных штаммов более перспективной стратегией является применение их в сочетании с антибиотиками. В настоящей работе был исследован сульфатиазол как наиболее известный представитель данной группы. Результаты, полученные для *K. rhizophila* DC2201 и *P. chlororaphis* 449, свидетельствуют об аддитивном антибиопленочном эффекте сульфатиазола в сочетании с антибиотиком азитромицином. В отношении биопленок *P. chlororaphis* 449 сульфатиазол 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.

В результате проведенных исследований нами 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. При стандартной процедуре поиска возможность пробиопленочной активности не определяется, и потенциальные пробиопленочные агенты могут быть отнесены к неэффективным препаратам. Сформулированный нами подход принес положительные результаты, что позволило обнаружить пробиопленочную активность у ряда соединений. Наиболее изученной группой стимуляторов биопленок являются антибиотики (Плакунов с соавт., 2017). Нами был выбран антибиотик азитромицин как широко применяемый в клинической практике для профилактики биопленочных инфекций. Нами показано, что антибиотик азитромицин, главным образом, стимулировал синтез полисахаридов ВПМ (Ганнесен с соавт., 2015; Мартьянов с соавт., 2015). Стимулирующий эффект антибиотика азитромицина, осложняющий его применение в химиотерапии инфекций нам удалось устранить при помощи традиционных биоцидов: 4-ГР, никлозамида и сульфатиазола.



Нами были также обнаружены пробиопленочные свойства никлозамида. Никлозамид заметно стимулировал QS-зависимую продукцию феназинов у мутантного штамма псевдомонад.

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 *S. violaceum* WT. Также нами была показана способность ДМСО проявлять синергидное индуцирующее действие сигнальных молекул C6-АГЛ на синтез виолацеина. «Интерпретация этих данных предполагает, как одну из возможностей, повышение в присутствии ДМСО сродства белка-рецептора, CviR к C6-АГЛ. Другая возможность – стабилизация формирующегося комплекса CviR с C6-АГЛ и обеспечение его взаимодействия с промотором оперона *vio*. Имеются данные о способности ДМСО влиять на конформацию белков в концентрациях, близких к использованным нами. Так, например, ДМСО в концентрации 8% активирует формирование и стабилизирует полимерную форму белка FtsZ в процессе сборки аппарата дивисомы, осуществляющей деление клеток многих эубактерий и архей (Chatterjee, Chakrabarti. 2014). Известно также, что ДМСО способен влиять на активность ряда ферментов, в частности он повышает активность рекомбинантной эстеразы (Chen et al., 2017). 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).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе детально изучен стимулирующий эффект суббактериостатических концентраций антибиотика азитромицина на рост микробных биопленок, осложняющий химиотерапию инфекций, вызываемых биопленочными патогенами. Впервые показана возможность применения ряда широко используемых в медицине и биотехнологии соединений (4-гексилрезорцина, никлозамида, сульфатаизола) в качестве антибиопленочных агентов как по отдельности, так и в сочетании с антибиотиком азитромицином, при этом указанные соединения устраняли стимулирующий эффект азитромицина на рост микробных биопленок. Впервые путем использования библиотеки Prestwick Chemical Library показана возможность применения как антибактериальных соединений (клиохинол, пипемидовая кислота, цефуроксим, бромид тонзония), так и противовирусных (азитотимидин) и сурфактантов (тилоксапол) в качестве антибиопленочных агентов в отношении как модельных, так и уропатогенных штаммов *E. coli*, а также описаны различные механизмы, лежащие в основе действия данных соединений.

Предложена оригинальная схема поиска как антибиопленочных так и пробиопленочных агентов, позволившая установить возможность использования широко применяемого органического растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) и антигельминтного препарата никлозамида в качестве пробиопленочных агентов, которые стимулируют биосинтез биологически активных веществ, находящих широкое применение в медицине и промышленности (виолацеина в биопленках *S. violaceum* и феназинов в биопленках и планктонной культуре *P. aeruginosa*). Обнаруженное явление может послужить основой для инновационного подхода к совершенствованию биотехнологического производства этих препаратов с помощью биопленок.

## 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: сульфатазиола 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 Prestwick 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 ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

- 4-ГР – 4-гексилрезорцин;
- АГЛ – ацилгомосеринлактон;
- АИ – автоиндуктор;
- АОБ – алкилоксибензолы
- ВПМ – внеклеточный полимерный матрикс;
- ДМСО – диметилсульфоксид;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИД<sub>50</sub> – ингибирующая доза antimicrobного препарата, подавляющая рост на 50 %;
- КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия;
- ОП – оптическая плотность;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- ПЭГ – полиэтиленгликоль;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- ЦВК – центральный венозный катетер;
- ц-ди-ГМФ – циклический гуанозиномонофосфат;
- СQ – клиохинол
- FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
- QQ – «выключатели» кворума;
- QS – «чувство кворума».
- QSI – ингибиторы «чувства кворума»

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганнесен А.В., Журина М.В., Веселова М.А., Хмель И.А., Плакунов В.К. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе *in vitro* // Микробиология. – 2015. – Т. 84 (3). – С. 281-290.
2. Гордеева С.В. Влияние алкилоксибензолов на ростовые и персистентные характеристики микроорганизмов. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Место защиты: ГОУВПО "Оренбургская государственная медицинская академия". – Оренбург, 2011. – 137 с.
3. Данилова Н.Д., Соловьева Т.В., Мартьянов С.В., Журина М.В., Ганнесен А.В. Стимулирующий эффект адреналина на биопленки *Micrococcus luteus* С01 // Микробиология. – 2020. – Т.89 (4). – С. 488 – 492.
4. 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.
5. Журина М.В., Кострикина Н.А., Паршина Е.А., Стрелкова Е.А., Юсипович А.И., Максимов Г.В., Плакунов В.К. Визуализация внеклеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов // Микробиология. – 2013. – Т.82 (4). – С. 502-509.
6. Зайцева Ю.В., Плюта В.А., Хмель И.А. Действие растительных веществ фенольной природы на образование бактериальных биопленок и quorum sensing системы регуляции // Материалы XXIII Международной зимней молодежной научной школы “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”. Москва, -2010. – С. 144.
7. Мартьянов С.В., Журина М.В., Эль-Регистан Г.И., Плакунов В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология. – 2015. – Т. 84 (1). – С. 27 – 36.
8. 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.
9. Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология. – 2006. – Т. 75 (4). – С. 489.

10. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – Т. 76 (2). – С. 149-163.
11. Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии. // Микробиология. – 2015. – Т. 84 (6). – С. 623 – 644.
12. Олескин А.В. Эль-Регистан Г.И., Шендеров Б.А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота – хозяин: роль нейромедиаторов // Микробиология. – 2016. – Т. 85 (1). – С. 3-25.
13. 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. 402 – 420.
14. Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках // Микробиология. – 2010. – Т. 79 (4). – С. 447-458.
15. 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.
16. Плюта В.А. Особенности образования биопленок и quorum sensing регуляция при действии антибактериальных агентов. Дис. канд. биол. наук. Москва, РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2014.
17. Степанова Т.В., Романова Ю.М., Алексеева Н.В. Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образуемых *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cenocepacia* // Фундаментальные основы лабораторной медицины. – 2010. – С. 47-51.
18. Стрелкова Е.А., Позднякова Н.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды // Микробиология. – 2013. – Т. 82 (2). – С. 131 – 138.
19. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета // Вестник РАМН. – 2012. – Т. 67 (12). – С. 22-29.
20. Abedon S.T. Spatial vulnerability: bacterial arrangements, microcolonies, and biofilms as responses to low rather than high phage densities // Viruses. – 2012. – V. 4. P. 663 – 687.

21. Adler J, Templeton B. The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli* // J Gen Microbiol. – 1967. – V. 46. P.175-184.
22. Aguilar F., Crebelli R., Dusemund B., Galtier P., Gott D., Gundert-Remy U., König J., Lambré C., Leblanc JC., Mortensen A., Mosesso P., Martin R., Parent-Massin D., Oskarsson A., Stankovic I., Tobback P., Waalkens-Berendsen I., Woutersen R.A., Wright M. Scientific Opinion on the reevaluation of 4-hexylresorcinol (E 586) as a food additive // EFSA Journal. – 2014. – V. 2(4). P. 3643.
23. Alkawash M.A., Soothill J.S., Schiller N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms //APMIS. – 2006. – V. 114. – P. 131-138.
24. Alsterholm M., Karami N., Faergemann J. Antimicrobial activity of topical skin pharmaceuticals – an in vitro study // Acta Derm Venereol. – 2010. – V. 90 (3). P. 239-45.
25. Attila C., Ueda A., Wood T.K. 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound //Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – V. 82. P. 525 – 533.
26. Babić F., Venturi V., Maravić-Vlahoviček G. Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhlI/R quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate // BMC Infectious Disease. – 2010. – V. 10 – P. 148.
27. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production // Antimicrob. Agents Chemother. -2004. – V. 48(4). – P. 1175-1187.
28. Banat I. M., Díaz De Rienzo M. A., Quinn G.A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – V. 98. – P. 9915 – 9929.
29. Barraud N., Kelso M. J., Rice S. A., Kjelleberg S. Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases // Curr. Pharm. Des. – 2015. – V. 21. – P. 31 – 42.
30. Bareggi S.R, Cornelli U. Clioquinol: review of its mechanisms of action and clinical uses in neurodegenerative disorders // CNS Neurosci Ther. 2012. – V. 18(1). – P. 41-46.
31. Beloin C., Renard S., Ghigo J.M., Lebeaux D. Novel approaches to combat bacterial biofilms // Curr. Opin. Pharmacol. – 2014. – V. 18. – P. 61 – 68.

32. Besharova O., Suchanek V.M., Hartmann R., Drescher K., Sourjik V. Diversification of gene expression during formation of static submerged biofilms by *Escherichia coli* // *Front Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P.1568.
33. Bhardwaj A.K., Vinothkumar K., Rajpara N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance // *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* – 2013. – V. 8. – P. 68-83.
34. Blankenfeldt W., Parsons J. F. The structural biology of phenazine biosynthesis // *Current opinion in structural biology.* – 2014. – V. 29. – P. 26-33.
35. Boehm A., Steiner S., Zaehring F., Casanova A., Hamburger F., Ritz D., Keck W., Ackermann M., Scimmer T., Jenai U. Second messenger signaling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V. 72. – P. 1500.
36. Bogachev M., Sharafutdinov I., Lodochnikova O., Kurbangalieva A., Fakhrullin R., Romanova Y., Pavlova A., Kayumov A., Khabibrakhmanova A., Rozhina E., Akhatova F. Unraveling the molecular mechanism of selective antimicrobial activity of 2(5H)-Furanone derivative against *Staphylococcus aureus* // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20 (3). – P. 694.
37. Bookstaver P.B., Rokas K.E., Norris L.B., Edwards J.M., Sherertz R.J. Stability and compatibility of antimicrobial lock solutions // *American journal of health-system pharmacy.* – 2013. – V 70 (24). – P. 2185-2198.
38. Brackman G., Defoirdt T., Miyamoto C. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR // *BioMedCentral Microbiology.* – 2008.—V 8. – P. 149.
39. Brameyer S., Kresovic D., Bode H.B., Heermann R. Dialkylresorcinols as bacterial signaling molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – V. 112. – P. 572 – 577.
40. Caldara M., Marmiroli N. Tricyclic antidepressants inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2018. – V. 52(4). – P. 500-505.
41. Calfee M.W., Coleman J.P., Pesci E. C. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* – 2001. – V. 98(20). – P. 11633 – 11637.
42. Cao B, Li J, Zhou X, Juan J, Han K, Zhang Z, Kong Y, Wang J, Mao X. Cloiquinol induces pro-death autophagy in leukemia and myeloma cells by 600 disrupting the mTOR signaling pathway // *Sci Rep.* – 2014. – V. 4. – P. 5749.



43. Carlier A., Uroz S., Smadja B., Fray R., Latour X., Dessaux Y., Faure D. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69 (8). – P. 4989-93.
44. Carmen J.C., Nelson J.L., Beckstead B.L., Runyan C.M., Robison R.A., Schaalje G.B., Pitt W.G. Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* // *J. Infect. Chemother.* – 2004. – V. 10 (4). – P. 193-9.
45. Carmen J.C., Roeder B.L., Nelson J.L., Beckstead B.L., Runyan C.M., Schaalje G.B., Robison R.A., Pitt W.G. Ultrasonically enhanced vancomycin activity against *Staphylococcus epidermidis* biofilms *in vivo* // *J. Biomater. Appl.* – 2004. – V. 18 (4). – P. 237 – 245.
46. Cavalli R., Gasco M.R., Chetoni P., Burgalassi S., Saettone M.F. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin // *Int. J. Pharm.* – 2002. – V. 238 (1-2). – P. 241-5.
47. Chan B.K., Abedon S.T. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control // *Curr. Pharm. Design.* – 2015. – V. 21. – P. 85 – 99.
48. Chan K.G., Atkinson S., Mathee K., Sam C.K., Chhabra S.R., Camara M., Koh C.K., Williams P. Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: Co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia* // *BMC Microbiology.* – 2011. – V. 51. P. 11.
49. Chan K.G., Yin W.F., Sam C.K., Koh C.L. A novel medium for the isolation of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – V. 36 (2). P. 247-51.
50. Chan-On W., Huyen N.T., Songtawee N., Suwanjang W., Prachayasittikul S., Prachayasittikul V. Quinoline-based clioquinol and nitroxoline exhibit anticancer activity inducing FoxM1 inhibition in cholangiocarcinoma cells // *Drug Des Devel Ther.* – 2015. – V.9. – P. 2033-47.
51. Chaudhari V., Gosai H., Raval S., Kothari V. Effect of certain natural products and organic solvents on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* // *Asian Pac. J. Trop. Med.* – 2014. V. 7. – P. 204 – 211.
52. Chen F., Gao Y., Chen X., Yu Z., Li X. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. (9). – P. 17477 – 17500.

53. Chen H., Wu B., Zhang T., Jia J., Lu J., Chen Z., Ni Z., Tan T. Effect of linker length and flexibility on the *Clostridium thermocellum* esterase displayed on *Bacillus subtilis* spores // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2017. – V. 182. – P. 168 – 180.
54. Chou, S.H., Guiliani, N., Lee, V., Römling, U. *Microbial cyclic di-nucleotide signaling.* Springer, 2020. P. 211-241.
55. Chu E.K., Kilic O., Cho H., Groisman A., Levchenko A. Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* // *Nat Commun.* – 2018. – V. 9(1). – P. 4087.
56. Cirioni O., Adikesavan N.V., Ghiselli R., Balaban N., Saba V., Orlando F., Shoham M., Silvestri C., Giacometti A., Kiran M.D., Scalise G. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening // *Mol. Pharmacol.* – 2008. – V. 73. (5). – P. 1578 – 1586.
57. Costerton J. W. How Bacteria Stick // *Sci. Am.* – 1978. – V. 238. – P. 86 – 95.
58. Curtin J., Cormican M., Fleming G. Linezolid compared with eperezolid, vancomycin, and gentamicin in an *in vitro* model of antimicrobial lock therapy for *Staphylococcus epidermidis* central venous catheter-related biofilm infections // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – V. 47 (10). – P. 3145-3148.
59. DePas W.H., Hufnagel D.A., Lee J.S., Blanco L.P., Bernstein H.C., Fisher S.T., James G.A., Stewart P.S., & Chapman, M. R. Iron induces bimodal population development by *Escherichia coli* // *PNAS.* – 2013. – V. 110 (7). P. 2629 – 2634.
60. Diaz De Rienzo M. A., Stevenson P.S., Marchant R., Banat I. M. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V. 100. – P. 5773 – 5779.
61. Díez-Martínez R., García-Fernández E., Manzano M., Martínez A., Domenech M., Vallet-Regí M. Auranofin-loaded nanoparticles as a new therapeutic tool to fight streptococcal infections // *Scientific Reports* – V. 6. – P. 19525.
62. Donelli G., Francolini I., Romoli D. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – V. 51 (8). – P. 2733-2740.

63. Dong Y.H., Xu J.L., Li X.Z., Zhang L.H. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. V 97(7). – P. 3526-31.
64. Donlan R. M. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? Ed by Romeo T. // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2008 – V. – P. 322, 133-161.
65. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Diseases // Emerg Infect Dis. – 2002. – V. 8 (9). – P. 881 – 890.
66. Donsì F., Annunziata M., Vincenzi M., Ferrari G. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier // J. Biotechnol. – 2012. – V. 159. – P. 342 – 350.
67. Doolittle M.M., Cooney J.J., Caldwell D.E. Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4 // Canadian journal of microbiology. – 1995. – V. 41(1). – P. 12-18.
68. Dusane D.H., Dam S., Nancharaiah Y.V., Kumar A.R., Venugopalan V.P., Zinjarde S.S. Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant // Aquat. Biosystems. – 2012. – V. 8. – P. 17 – 24.
69. Dusane D.H., Nancharaiah Y.V., Zinjarde S.S., Venugopalan V.P. Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms // Colloid. Surf. B. Biointerfaces. – 2010. – V. 81. – P. 242 – 248.
70. Dwyer D.J., Belenky P.A., Yang J.H., MacDonald I.C., Martell J. D., Takahashi N., Chan C. T., Lobritz M.A., Braff D., Schwarz E.G., Ye J.D., Pati M., Vercruyse M., Ralifo P.S., Allison K.R., Khalil A.S., Ting A.Y., Walker G.C., Collins J.J. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality // PNAS. – 2014. – V. 111(20). – P. E2100 – E2109.
71. Eberl L. N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria // Syst. Appl. Microbiol. – 1999. – V. 22. – P. 493 – 506.
72. El-Registan, G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Y.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology – 2006. – V. 75. – P. 380 – 389.
73. Evans K., Passador L., Srikumar R., Tsang E., Nezezon J., Poole K. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180. – P. 5443-5447.

74. Filloux A., Ramos J.L. *Pseudomonas* methods and protocols // *Methods in molecular biology*, V. 1149. New York: Humana Press, 2014. P. 800.
75. Friedlander R.S., Vogel N., Aizenberg J. Role of flagella in adhesion of *Escherichia coli* to abiotic surfaces // *Langmuir*. – 2015. – V. 31. – P. 6137 – 6144.
76. Furukawa K., Gu H., Sudarsan N., Hayakawa Y., Hyodo M., R Breaker R. Identification of ligand analogs that control c-di-GMP riboswitches // *ACS chemical biology*. – 2012. – V.7. – P. 1436-43.
77. Gambino M, Cappitelli F. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress // *Biofouling*. – 2016. – V. 32(2). – P. 167-178
78. Gannesen A.V, Lesouhaitier O., Racine P.J, et al. Regulation of monospecies and mixed biofilms formation of skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by human natriuretic peptides // *Front Microbiol*. – 2018. – V.9. – P. 2912.
79. Ganin H., Tang X., Meijler M. M. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by AI-2 analogs // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. – 2009. – V. 19 (14). – P. 3941 – 4.
80. Gao M., Teplitski M., Robinson J. B., Bauer W. D. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing // *Mol. Plant. Microbe Interact*. – 2003. V 16. – P. 827-34.
81. Giacomucci S, Cros CD, Perron X, Mathieu-Denoncourt A, Duperthuy M. Flagella-dependent inhibition of biofilm formation by sub-inhibitory concentration of polymyxin B in *Vibrio cholera* // *PLoS One*. – 2019. – V. 14(8). – P. e0221431.
82. Gieringer J. H., Wenz A. F., Just H. M., Daschner F. D. Effect of 5-fluorouracil, mitoxantrone, methotrexate, and vincristine on the antibacterial activity of ceftriaxone, ceftazidime, cefotiam, piperacillin, and netilmicin // *Chemotherapy*. – 1986. – V. 32. – P. 418 – 424.
83. Gusarov I, Nudler E. NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria // *Proceeding of the National Academy of United States of America*. – 2005. – V. 102. – P. 13855 – 13860.
84. Guttenberger N., Blankenfeldt W., Breinbauer R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products // *Bioorg. Med. Chem*. – 2017. – V. 25 (22). – P. 6149-6166.

85. Gwisai T., Hollingsworth N. R., Cowles S., Tharmalingam N, Mylonakis E, Fuchs BB, Shukla A. Repurposing niclosamide as a versatile antimicrobial surface coating against device-associated, hospital-acquired bacterial infections // *Biomed Mater.* – 2017. – V. 12(4). – P. 045010.
86. Hall S., McDermott C., Anoopkumar-Dukie S., McFarland A. J., Forbes A., Perkins A.V., Davey A.K., Chess-Williams R., Kiefel M. J., Arora D., Grant D. G. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* // *Toxins (Basel)* – 2016. – V. 8(8). – P. 236.
87. Hasan J., Crawford R. J., Ivanova E. P. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials // *Trend. Biotechnol.* – 2013. – V. 31. – P. 295 – 304.
88. Hauck D., Joachim I., Frommeyer B., Varrot A., Philipp B., Möller H.M., Imberty A., Exner T. E., Titz A. Discovery of two classes of potent glycomimetic inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* LecB with distinct binding modes // *ACS Chem Biol.* – 2013 – V. 8 (8). – P.1775-84.
89. He N., Hu J., Liu H., Zhu T., Huang B., Wang X., Wu Y., Wang W., Qu D. Enhancement of vancomycin activity against biofilms by using ultrasound-targeted microbubble destruction // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – V. 55.11. – P. 5331 – 5337.
90. Heidelberger C., Chaudhuri N. K., Danneberg P., Mooren D., Griesbach L., Duschinsky R. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds // *Nature.* – 1957. – V. 179. – P. 663 – 666.
91. Hoang T.T., Schweizer H.P. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis // *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181. – P. 5489 – 5497.
92. Hoffman L., D'Argenio D., MacCoss M., Zhang Z., Jones R., Miller S. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation // *Nature.* – 2005. – V. 436 – P. 1171-1755.
93. Hoffmann N., Lee B., Hentzer M., Rasmussen T.B., Song Z., Johansen H.K. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and -growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cfr(-/-) mice // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2007. – V. 51 – P. 3677-3687.
94. Hancock V, Dahl M, Klemm P. Abolition of biofilm formation in urinary tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates by metal interference through competition for fur // *Appl Environ Microbiol.* – 2010. – V. 12. – P.3836-3841.

95. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections // *Apmis.* – 2017. – V. 125 (4). – P. 272 – 275.
96. Hurler J., Sørensen K.K., Fallarero A., Vuorela P., Škalko-Basnet N. Liposomes-in-hydrogel delivery system with mupirocin: *in vitro* antibiofilm studies and *in vivo* evaluation in mice burn model // *Biomed. Res.* – 2013. doi:10.1155/2013/498485.
97. Hymes S.R., Randis T.M., Sun T.Y., Ratner A.J. DNase inhibits *Gardnerella vaginalis* biofilms *in vitro* and *in vivo* // *J. Infect. Dis.* – 2013. – V. 207 (10). – P. 1491 – 1497.
98. Inoue Y., Shiraishi A., Hada T., Hirose K., Hamashima H., Shimada J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action // *FEMS microbiology letters* – 2004. – V. 237(2). – P. 325 – 331.
99. Imperi F., Massai F., Pillai C. R., Longo F., Zennaro E., Rampioni G., Visca P., Leoni L. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing // *Antimicrob. Agent. Chemother.* – 2013. – V. 57. – P. 996 – 1005.
100. Jakobsen T. H., Bragason S. K., Phipps R. K., Christensen L. D., Gennip M. van, Alhede M., Skindersoe M., Larsen T. O., Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M. Food as a source for quorum sensing inhibitors: Iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78 (7). – P. 2410 – 2421.
101. Jakobsen T.H., Gennip M., Phipps R.K. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – V. 56 (5). – P. 2314-2325.
102. Janssens J.C.A., Steenackers H., Robijns S. Furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar typhimurium // *Applied Environmental Microbiology.* – 2008. – V. 74 (21). – P. 6639 – 6648.
103. Jesorka A, Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications // *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif).* – 2008. – V. 1. – P. 801 – 832.
104. Joffe L.S, Schneider R., Lopes W. The Anti-helminthic Compound Mebendazole has multiple antifungal effects against *Cryptococcus neoformans* // *Frontiers in Microbiology.* – 2017. – V. 8. – P. 535.
105. Jones H.C., Roth I.L. Sanders W.M. Electron microscopic of a slime layer., 1969, 99, 316-25 // *J. Bacteriol.* – 1969. – V. 99 (I). – P. 316 – 25.

106. K. Bhardwaj A., Vinothkumar K., Rajpara N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance // *Recent Pat. Antiinfect. Drug. Discov.* – 2013. – V. 8 (1). – P. 68 – 83.
107. Kalia V.C., Wood T.K., Kumar P. Evolution of resistance to quorum sensing inhibitors // *Microb. Ecol.* – 2014. – V. 68. – P. 13 – 23.
108. Kandemir O., Oztuna V., Milcan A. Clarithromycin destroys biofilms and enhances bactericidal agents in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis // *Clinical orthopaedics and related research.* – 2005. – V. 430. – P. 171-175.
109. Kaplan J.B., LoVetri K., Cardona S.T., Madhyastha S., Sadovskaya I., Jabbouri S., Izano E.A. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci // *J. Antibiot. (Tokyo).* – 2012. – V. 65(2). – P. 73-7.
110. Kaplan J.B., Rangunath C., Ramasubbu N., Fine D.H. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity // *J. Bacteriol.* – 2003. – V. 85(16). – P. 4693-8.
111. Kaufmann G.F., Sartorio R., Lee S., Mee J.M., Altobell L.J., Kujawa D.P., Jeffries E., Clapham B., Meijler M.M., Janda K.D. NIH Public Access // 2008. – V. 128 (9). – P. 2802 – 2803.
112. Kavanaugh J.S., Thoendel M., Horswill A.R. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing // *Mol Microbiol.* – 2007. – V. 65 (3). – P.780-98.
113. Kay M.K., Erwin T.C., McLean R.J.C., Aron G. M. Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – P. 821 – 829.
114. Kayumov A.R., Khakimullina E.N., Sharafutdinov I.S., Trizna E.Y., Latypova L.Z., Thi Lien H., Margulis A.B., Bogachev M.I., Kurbangalieva A.R. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones // 2015. – V. 68(5). – P. 297-301.
115. Kemme M., Heinzl-Wieland R. Quantitative assessment of antimicrobial activity of PLGA films loaded with 4-Hexylresorcinol // *J. Funct. Biomater.* – 2018. – V. 9(4). doi:10.3390/jfb9010004
116. Kendall M.M., Rasko D.A., Sperandio V. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a luxS mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. P.: 4875-84.

117. Kendall M.M, Sperandio V. Cell-to-Cell signaling in *Escherichia coli* and *Salmonella* // EcoSal Plus. 2014. V 6(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2013.
118. Khanal M., Larsonneur F., Raks V., Barras A., Baumann J.S., Martin F.A., Boukherroub R., Ghigo J.M., Ortiz Mellet C., Zaitsev V., Garcia Fernandez J.M., Beloin C., Siriwardena A., Szunerits S. Inhibition of type 1 fimbriae-mediated *Escherichia coli* adhesion and biofilm formation by trimeric cluster thiomannosides conjugated to diamond nanoparticles // Nanoscale. – 2015. – V. 7 (6). – P. 2325-35.
119. Kimkes T.E.P., Heinemann M. Reassessing the role of the *Escherichia coli* CpxAR system in sensing surface contact // PLoS One. 2018. V. 13(11). P. e0207181
120. Krammer E.M., de Ruyck J., Roos G., Bouckaert J., Lensink M.F. Targeting dynamical binding processes in the design of non-antibiotic anti-adhesives by molecular simulation-the example of FimH // Molecules. – 2018. – V. 23 (7). – P.1641.
121. Kumar A., Ting Y.P. Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation // Colloid. Surf. B Biointerfaces. – 2013. V. 111. P. 747 – 754.
122. Kumar A., Ting Y.P. Streptomycin favors biofilm formation by altering cell surface properties // Appl Microbiol Biotechnol. – 2016. – V. 100. P. 8843 – 8853.
123. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – V. 8. – P. 317-327.
124. Lappin-scott H.M. Claude E . Zobell – his life and contributions to biofilm microbiology // 8th Int. Symp. Microb. Ecol. – 1999. – P. 6.
125. LaSarre B., Federle M.J. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens // Microbiol Mol Biol Rev. – 2013. – V. 77 (1). – P.73 – 111.
126. Leadbetter J.R., Greenberg E. P. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus* // Journal of Bacteriology/ 2000. – V. 24. – P. 6921-6926.
127. Lesic B., Lépine F., Déziel E. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. // PLoS Pathog. – 2007. – V. 3 (9). – P. 1229 – 1239.
128. Lesouhaitier O., Clamens T., Rosay T., et al. Host peptidic hormones affecting bacterial biofilm formation and virulence // J Innate Immun. – 2019. – V. 11(3). – P. 227-241.



129. Lin Y.H., Xu J.L., Hu J., Wang L.H., Ong S.L., Leadbetter J.R., Zhang L.H. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes // *Mol Microbiol.* – 2003. – V. 47 (3). – P. 849-60.
130. Lin M.H., Shu J.C., Huang H.Y., Cheng Y.C. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus* // *PLoS One.* – 2012. – V. 7(3). P. e34388.
131. Lin J., Cheng J., Wang Y., Shen X. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not just for quorum sensing anymore // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2018. – V. 8. P. 230.
132. Linares J.F., Gustafsson I., Baquero F., Martinez J.L. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – P. 19484-19489.
133. Lonn-Stensrud J., Landin M.A., Benneche T., Petersen F.C., Scheie A.A. Furanones, potential agents for preventing *Staphylococcus epidermidis* biofilm infections? // *J. Antimicrob. Chemother.* – V. 63. – P. 309 – 316.
134. Lyon G.J., Mayville P., Muir T.W., Novick R.P. Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – P.13330-13335.
135. Lyte M., Freestone P. P., Neal C.P., Olson B.A., Haigh R.D., Bayston. R., Williams, PH. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes // *Lancet.* – 2003. – V. 361. – P. 130 – 135.
136. Macpherson L.J, Dubin A.E, Evans M.J., Marr F., Schultz P.G., Cravatt B.F., Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines // *Nature*-2007. – V. 445 (7127) – P. 541-545.
137. Manefield M., de Nys R.N., Kumar R. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein // *Microbiology.* – 1999. – V. 145. – P. 283-291.
138. Marques C.N., Davies D.G., Sauer K. Control of biofilms with the fatty acid signaling molecule cis-2-decenoic acid // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2015. – V. 8. – P. 816 – 835.
139. Martin C., Low W.L., Gupta A., Amin M.C., Radecka I., Britland S. T., Raj P., Kenward K. M. Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm // *Curr. Pharm. Des.* – 2015. – V. 21. – P. 43 – 66.

140. Mayville P., Ji G., Beavis R., Yang H., Goger M., Novick R.P., Muir T.W. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1999. – V. 96. – P. 1218 – 1223.
141. McDowell P., Affas Z., Reynolds C., Holden M.T., Wood S. J., Saint S. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus* // Mol Microbiol. – 2001. – V. 41. – P. 503-12.
142. McInerney M.P., Volitakis I., Bush A.I., Banks A., Short J.L., Nicolazzo J.A. Ionophore and biometal modulation of P-glycoprotein expression and function in human brain microvascular endothelial cells // Pharm. Res. – 2018. – V. 35 (4). – P. 83.
143. Michiels J., Fauvart M. Bacterial persistence: methods and Protocols. Springer, 2016.
144. Miller S.I., Pulkkinen W.S., Selsted M. E., Mekalanos J. J. Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium* // Infection and immunity. – 1990. – V.11. – P. 3706-3710.
145. Mlynek K.D., Callahan M.T., Shimkevitch A.V., Farmer J.T., Endres J.L., Marchand M., Bayles K.W., Horswill A.R., Kaplan J.B. Effects of low-dose amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 biofilms // Antimicrob //Agents Chemother. – 2016. – V. 60. – P. 2639 – 2651.
146. Moskaleva E.Y., Perevozchikova V.G., Zhirnik A.S., Severin S.E. Molecular mechanisms of niclosamide antitumor activity // Biomed. Khim. – 2015, – V. 616. – P. 680 – 693.
147. Mount K.L.B., Townsend C.A., Rinker S.D., Gu X., Fortney, K.R., Zwickl B.W., Janowicz, D.M., Spinola S.M., Katz B.P., Bauer M.E. *Haemophilus ducreyi* SapA contributes to cathelicidin resistance and virulence in humans.// Infection and immunity. – 2010. – V. 78. (3). – P. 1176-1184.
148. Musthafa K.S., Ravi A.V., Annapoorani A., Packiavathy I.S.V., Pandian S.K. Evaluation of anti-quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the n-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* // Chemotherapy. – 2010. – V. 56 (4). – P. 333 – 339.
149. N'Diaye A., Gannesen A., Borrel V. Substance P and calcitonin gene-related peptide: key regulators of cutaneous microbiota homeostasis //Front Endocrinol (Lausanne). – 2017. – V. 8. – P. 15.

150. Neoh K.G., Kang E.T. Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications // *ACS, Applied Materials & Interfaces*. – 2011. V. 3. – P. 2808-2819.
151. Ng S.M. S., Sioson J.S.P., Yap J.M., Ng F.M., Ching H.S.V., Teo J.W.P., Jureen R., Hill J., Chia C.S.B. Repurposing zidovudine in combination with tigecycline for treating carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2018. – V. 37 (1). – P. 141-148.
152. Nijland R., Hall M.J., Burgess G.J. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase // *PLoS One*. – 2010. – V. 5 (12). – P. 15668.
153. Nikolaev Y.A, Tutel'yan A.V., Loiko N.G., Buck J., Sidorenko S.V., Lazareva I., Gostev V., Manzen'yuk O.Y., Shemyakin I.G., Abramovich R.A., Huwyler J., El'-Registan G.I. The use of 4-Hexylresorcinol as antibiotic adjuvant // *PLoS One*. 2020. – V. 15(9). – P. e0239147.
154. Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 2001. – V. 183(20). – P. 5803-5812.
155. Noelting J., Jurewitsch B., Allard J.P. Non-antibiotic antimicrobial catheter lock solutions in patients on home parenteral nutrition // *Nutrients*. – 2018. V 10 (9). – P.1165.
156. Novick R.P., Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci // *Annu. Rev. Genet.* – 2008. – V. 42. – P. 541-64.
157. Nucleo E. Steffanoni L., Fugazza G., Migliavacca M., Giacobone E., Navarra N., Pagani L., Landini P. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* // *BMC Microbiology*. – 2009. – V. 9. P. 270.
158. O'Loughlin C.T, Miller L.C., Siryaporn A., Drescher K., Semmelhack M.F., Bassler B.L. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2013. – V. 110 (44). – P. 17981 – 17986.
159. O'Toole G. Microtiter dish biofilm formation assay. // *J. Vis. Exp.* – 2011. – V. 30. – P.2437.
160. Pan J., Bahar A.A., Syed H., Ren D. Reverting antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 persister cells by (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-methylfuran-2(5H)-one // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – P. 45778.

161. Pan J. X., Ding K., Wang C.Y. Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells // Chinese J. Cancer. – 2012, – V. 31, – P. 78 – 84.
162. Papaioannou E., Wahjudi M., Nadal-Jimenez P., Koch G., Setroikromo R., Quax W.J. Quorum-quenching acylase reduces the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Caenorhabditis elegans* infection model // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – V. 53 (11). – P. 4891 – 4897.
163. Park S.J., Park S.Y., Ryu C.M., Park S.H., Lee J.K. The role of AiiA, a quorum-quenching enzyme from *Bacillus thuringiensis* on the rhizosphere competence // J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 18. – P. 1518 – 1521.
164. Park S.Y., Lee S.J., Oh T.K., Oh J.W., Koo B.T., Yum D.Y., Lee J. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria // Lee J. Microbiology. – 2003. – V. 149 (6). – P.1541-1550.
165. Park J., Jagasia R., Kaufmann G.F., Mathison, J.C., Ruiz, D.I., Moss, J.A., Meijler M.M., Ulevitch R.J., Janda K.D. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling // Chemistry & biology. – 2007. – V. 14. – P. 1119 – 1127.
166. Parsek M.R., Val D.L., Hanzelka B. L., Cronan, J.E., Greenberg, E.P. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – V. 96. – P. 4360 – 4365.
167. Parveen N., Cornell K.A. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism // Mol Microbiol. – 2011. – V. 79 (1). – P. 7-20.
168. Pascoe B.; Dams L.; Wilkinson T.S.; Harris L.G., Bodger O., Mack D., Davies A.P. Dormant cells of *Staphylococcus aureus* are resuscitated by spent culture supernatant // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – P. 85998.
169. Pearson J.P., Van Delden C., Iglewski B.H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals // J. Bacteriol. – 1999. – V. 181. – P. 1203 – 1210.
170. Perras A.K., Daum B., Ziegler C., Takahashi L.K., Ahmed M., Wanner G., Klingl A., Leitinger G., Kolb-Lenz D., Gribaldo S., Auerbach A., Mora M., Probst A.J., Bellack A., Moissl-Eichinger C. S-layers at second glance? Altiarchaeal grappling hooks (hami) resemble archaeal S-layer proteins in structure and sequence // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – P. 543.

171. Philips J., Rabaey K., Lovley D.R., Vargas M. Biofilm formation by *Clostridium ljungdahlii* is induced by sodium chloride stress: experimental evaluation and transcriptome analysis // PLoS One. 2017. V. 12(1). P. e0170406.
172. Pinnow N., Liese A., Schmitz R.A., Kisch M.J., Weiland-Bräuer N. Highly effective inhibition of biofilm formation by the first metagenome-derived AI-2 quenching enzyme // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7. – P. 1 – 19.
173. Pleszczyńska M., Wiater A., Janczarek M., Szczodrak J. (1→3)- $\alpha$ -d-Glucan hydrolases in dental biofilm prevention and control: A review // Int. J. Biol. Macromol. – 2015. – V. 79. – P. 761 – 778.
174. Plyuta V.A., Lipasova V.A., Koksharova O.A., Veselova M.A., Kuznetsov A.E., Khmel I. A. The effect of introduction of the heterologous gene encoding the N-acyl-homoserine lactonase (aiiA) on the properties of *Burkholderia cenocepacia* // Russ. J. Genet. – 2015. – V. 51. – P. 737 – 744.
175. Prince L.R., Bianchi S.M., Vaughan K.M., Bewley M.A., Marriott H.M., Walmsley S.R., Taylor G.W., Buttle D.J., Sabroe I., Dockrell D.H., Whyte M.K. Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin // J. Immunol. – 2008.- V. 180(5). – P. 3502 – 3511.
176. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O. Agents that inhibit bacterial biofilm formation // Future Med. Chem. – 2015. – V. 7 (5). – P.647-671.
177. Rahmani-Badi A., Sepehr S., Mohammadi P., Soudi M.R., Babaie-Naiej H., Fallahi H. combination of cis-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms // J. Med. Microbiol. – 2014. – V. 63. – P. 1509 – 1516.
178. Rasch M., Buch C., Austin B., Slierendrecht W.J., Ekmann K.S., Larsen J.L., Johansen C., Riedel K., Eberl L., Givskov M., Gram L. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) // Syst. Appl. Microbiol. – 2004. – V. 27. – P.350 – 359
179. Rasko D.A., Moreira C.G., Li de R., Reading N.C., Ritchie J.M., Waldor M.K., Williams N., Taussig R., Wei S., Roth M., Hughes D.T., Huntley J.F., Fina M.W., Falck J.R., Sperandio V. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development // Science. – 2008. – V. 22 (321). – P. 1078-1080.

180. Rasmussen T.B., Givskov M. Quorum sensing inhibitors: A bargain of effects // *Microbiology*. – 2006. – V. 152 (4). – P. 895 – 904.
181. Ren D., Bedzyk L.A., Ye R.W. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli* // *Biotechnol. Bioeng.* – 2004. – V. 88. – P. 630-642.
182. Ren D., Sims J.J., Wood T.K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone // *Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 3. – P. 731-736.
183. Ren D., Sims J.J., Wood T.K., 2002. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2002. – V. 34. – P. 293-299.
184. Rendueles O., Ghigo J.M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2012. – V. 36. – P. 972 – 989.
185. Rivardo F., Turner R.J., Allegrone G., Ceri H., Martinotti M.G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – V. 83 (3). – P. 541-53.
186. Rowat A. C, Keller D., Ipsen J.H. Effects of farnesol on the physical properties of DMPC membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1713(1). – P.29-39.
187. Roy V., Meyer M.T., Jacqueline A.I. AI-2 analog and antibiotics: a synergistic approach to reduce bacterial biofilms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – V. 97 (6). – P. 2627-38.
188. Ryan E.M., Alkawareek M.Y., Donnelly R.F. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms *in vitro* // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2012. – V. 65 (2). – P. 395-398.
189. Sack U., Walther W., Scudiero D., Selby M., Kobelt D., Lemm M., Fichtner I., Schlag P.M., Shoemaker R.H., Stein U. Novel effect of antihelminthic niclosamide on S100A4-mediated metastatic progression in colon cancer // *J. Nat. Cancer Inst.* – 2011. – V. 103. – P. 1018 – 1036.
190. Sambanthamoorthy K., Sloup R.E., Parashar V., Smith J.M., Kim E.E., Semmelhack M.F., Neiditch M.B., Waters C.M. Identification of small molecules that antagonize diguanylate cyclase enzymes to inhibit biofilm formation // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – V. 56 (10). – P. 5202 – 5211.

191. Saputo S., Faustoferri R.C., Quivey R.G. A drug repositioning approach reveals that *Streptococcus mutans* susceptible to a diverse range of established antimicrobials and nonantibiotics // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2018. – V. 62 (1). – P.1674-1617.
192. Sara J.D., Kaur J., Khodadadi R., Rehman M., Lobo R., Chakrabarti S., Herrmann J., Lerman A., Grothey A. 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review // *Ther. Adv. Med. Oncol.* – 2018. doi: 10.1177/1758835918780140.
193. Schembri, M.A., Klemm P. Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – P. 3074 – 3081.
194. Schreiber F., Beutler M., Enning D. The role of nitric-oxide-synthase-derived nitric oxide in multicellular traits of *Bacillus subtilis* 3610: biofilm formation, swarming, and dispersal // *BMC Microbiology*. – 2011. – V. 11. – P. 111
195. Shields R.C., Mokhtar N., Ford M. Efficacy of a marine bacterial nuclease against biofilm microorganisms isolated from chronic rhinosinusitis // *PLoS One*. – 2013. – V. 8 (2). – P. 55339.
196. Siles S.A, Srinivasan A, Pierce C.G, Lopez-Ribot J.L., Ramasubramanian A.K. High-throughput screening of a collection of known pharmacologically active small compounds for identification of *Candida albicans* biofilm inhibitors // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2013. – V. 57 (8). – P. 3681-3687.
197. Sims K.R., Liu Y., Hwang G., Jung H.I., Koo H., Benoit D.S.W. Enhanced design and formulation of nanoparticles for anti-biofilm drug delivery // *Nanoscale* – 2018. V. 11(1). P.219-236.
198. Sio C.F., Otten L.G., Cool R.H., Diggle S.P., Braun P.G., Bos R., Daykin M., Cámara M., Williams P., Quax W.J. Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // *Infect. Immun.* – 2006. – V. 74 (3). – P. 1673-1682.
199. Skindersoe M.E., Alhede M., Phipps R., Yang L., Jensen P.O., Rasmussen T.B. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – V. 52. – P. 3648-3663.
200. Sotirova A.V., Spasova D.I., Galabova D.N., Karpenko E., Shulga A. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains // *Curr Microbiol.* – 2008. – V. 56. – P. 639 – 644.
201. Starkey M., Lepine F., Maura D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., He J., Kitao T., Righi V., Milot S., Tzika A., Rahme L. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-

- sensing regulated acute and persistent pathogenicity // PLoS Pathog. – 2014. – V. 10(8) – P. 1004321.
202. Steenackers H.P., Levin J., Janssens J.C., Weerdt A. De, Balzarini J., Vanderleyden J., Vos D.E. De, Keersmaecker S.C. De Structure-activity relationship of brominated 3-alkyl-5-methylene-2(5H)-furanones and alkylmaleic anhydrides as inhibitors of *Salmonella* biofilm formation and quorum sensing regulated bioluminescence in *Vibrio harveyi* // Bioorganic. Med. Chem. – 2010. – V. 18 (14). – P. 5224 – 5233.
203. Stewart P.S., Franklin M.J., Williamson K.S., Folsom J.P., Boegli L., James G.A. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2015. – V. 59. – P.3838 – 3847.
204. Strathmann M., Wingender J., Flemming H.C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Microbiol. Methods. – 2002. – V. 50. – P.237 – 248.
205. Subbiahdoss G., Sharma P.K., van der Mei H.C., Das T., Sharifi S., Krom B.P., Busscher H.J., Swartjes J.T.M. A Functional DNase I coating to prevent adhesion of bacteria and the formation of biofilm // Adv. Funct. Mater. – 2013. – V. 23 (22). – P. 2843 – 2849.
206. Takano E., Nihira T., Hara Y., Jones J.J., Gershater C.J., Yamada Y. Purification and structural determination of SCB1, a gammabutyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – P. 11010-11016.
207. Tamura S., Yonezawa H., Motegi M., Nakao R., Yoneda S., Watanabe H., Yamazaki T., Senpuku H. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans* // Oral Microbiol. Immunol. – 2009. V. 24. – P.152 – 161.
208. Tateda K, Standiford T.J., Pechere J.C., Yamaguchi K. Regulatory effects of macrolides on bacterial virulence: potential role as quorum-sensing inhibitors // Curr. Pharm. Des. – 2004. V 10. – P. 3055-3065.
209. Tavares G.S.V., Mendonça D.V.C., Lage D.P., Granato J.D.T., Ottoni F.M., Ludolf F., Chávez-Fumagalli M.A., Duarte M.C., Tavares C.A.P., Alves R.J., Coimbra E.S., Coelho E.A.F. Antileishmanial activity, cytotoxicity and mechanism of action of clioquinol against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* species // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. – 2018. – V. 123 (3). – P. 236-246.



210. Thangamani S., Maland M., Mohammad H., Pascuzzi P.E., Avramova L., Koehler C.M., Hazbun T.R., Seleem M.N. Repurposing Approach Identifies Auranofin with Broad Spectrum Antifungal Activity That Targets Mia40-Erv1 Pathway. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* – 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00004.
211. Tinh N.T., Linh N.D., Wood TK., Dierckens K., Sorgeloos P., Bossier P. Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis* // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – V. 103 (1). – P.194-203.
212. Torres M., Uroz S., Salto R., Fauchery L., Quesada E., Llamas I. HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7 (1). – P. 1 – 15.
213. Torres N.S., Abercrombie J.J., Srinivasan A., Lopez-Ribot J.L, Ramasubramanian A.K., Leung K.P. Screening a commercial library of pharmacologically active small molecules against *Staphylococcus aureus* biofilms // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2016. – V. 60 (10). – P. 5663-72.
214. Torres N.S, Montelongo-Jauregui D., Abercrombie J.J, Srinivasan A., Lopez-Ribot J.L., Ramasubramanian A. K, Leung K. P. Antimicrobial and antibiofilm activity of synergistic combinations of a commercially available small compound library with colistin against *Pseudomonas aeruginosa* // *Front. Microbiol.* – 2018. – V. 9. – P. 2541.
215. Trizna E.Y., Khakimullina E.N., Latypova L.Z., Kurbangalieva A.R., Sharafutdinov I.S., Evtyugin V.G., Babynin E.V., Bogachev M.I., Kayumov A.R. Thio Derivatives of 2(5H)-furanone as inhibitors against *Bacillus subtilis* biofilms // *Acta Naturae.* – 2015. – V. 7 (2). – P. 102 – 107.
216. Turnbull L., Toyofuku M., Hynen A. et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms // *Nat. Commun.* – 2016. – V.7. – P. 11220.
217. Ueda A., Attila C., Whiteley M., Wood T.K. Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist // *Microb. Biotechnol.* – 2009. – V. 2. – P. 62 – 74.
218. Uroz S., Chhabra R.S., Cámara M., Williams P., Oger P., Dessaux Y. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities // *Microbiology (Reading, England).* – 2005. – V. 151. – P. 3313-3322.

219. Uroz S., Dessaux Y., Oger P. Quorum sensing and quorum quenching: The Yin and Yang of bacterial communication // *ChemBioChem*. – 2009. – V. 10(2). – P. 205 – 216.
220. Valentini M., Filloux A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V. 291 (24). – P. 12547 – 12555.
221. Vikram A., Jayaprakasha G.K., Uckoo R.M., Patil B.S. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 motility and biofilm by  $\beta$ -Sitosterol glucoside // *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* – 2013. – V. 1830 (11). – P. 5219 – 5228.
222. Vikram A., Jesudhasan P.R., Jayaprakasha G.K., Pillai B.S., Patil B.S. Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm // *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – V. 140 (2 – 3). – P. 109 – 116.
223. Wagner S., Hauck D., Hoffmann M., Sommer R., Joachim I., Müller R., Imberty A., Varrot A., Titz A. Covalent lectin inhibition and application in bacterial biofilm imaging // *Angewandte Chemie*. – 2017. doi 10.1002/ange.201709368
224. Walz J.M., Avelar R.L., Longtine K.J., Carter K.L., Mermel L.A., Heard S.O. Anti-infective external coating of central venous catheters: a randomized, noninferiority trial comparing 5-fluorouracil with chlorhexidine/silver sulfadiazine in preventing catheter colonization // *Crit. Care Med.* – 2010. – V. 38. – P. 2095 – 2102.
225. Wang S., Chen T., Chen R., Hu Y., Chen M., Wang Y. Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies // *Int. J. Pharm.* – 2012. V. 430 (1-2). – P. 238 – 246.
226. Wang T., Zheng W., Xu H., Zhou J.M., Wang Z.Y. Clioquinol inhibits zinc-triggered caspase activation in the hippocampal CA1 region of a global ischemic gerbil model // *PLoS One*. – 2010. – V. 5 (7). – P. 11888.
227. Wiederhold N.P., Patterson T.F., Srinivasan A., Chaturvedi A. K., Fothergill A.W, Wormley F. L., Ramasubramanian A. K., Lopez-Ribot J. L. Repurposing auranofin as an antifungal: *In vitro* activity against a variety of medically important fungi // *Virulence*. – V. 8(2). – P.138-142.
228. Wong C.S, Yin W.F., Sam C.K., Koh C.L., Chan K. Characterization of wetland quorum quenching *Pseudomonas aeruginosa* strain 2SW8 and its 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone production // *New Microbiol.* – 2012. – V. 35 (1). – P. 43-51.

229. Wright J.S., Jin R., Novick R.P. Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2005. – V. 102. – P. 1691 – 1696.
230. Wu S., Li X., Gunawardana M., Maguire K., Guerrero-Given D., Schaudinn C., Wang C., Baum M.M., Webster P. Beta-lactam antibiotics stimulate biofilm formation in non-typeable *Haemophilus influenzae* by up-regulating carbohydrate metabolism // PLoS One. -2014. – V. 9(7): e99204.
231. Xavier K.B., Bassler B.L. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication // Nature. – 2005. – V. 437 (7059). – P. 750 – 753.
232. Yeo J., Dippel A.B., Wang X.C., Hammond M.C. *In vivo* biochemistry: single-cell dynamics of cyclic di-GMP in *Escherichia coli* in response to zinc overload // Biochemistry. – 2017. – V. 57 (1). – P. 108 – 116.
233. You Z., Ran X., Dai Y., Ran Y. Clioquinol, an alternative antimicrobial agent against common pathogenic microbe // J.Mycol. Med. – 2018. – V. 28 (3). – P. 492-501.
234. Yu Q., Wu Z., Chen H. Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications // Acta Biomater. – 2015. doi 10.1016/j.actbio.2015.01.018
235. Zhang L.H. Quorum quenching and proactive host defense // Trends Plant. Sci. – 2003. – V. 8. – P. 238-44.
236. Zhang X.S., García-Contreras R., Wood T.K. *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA) // ISME J. 2008. V. 2(6). P. 615-631.
237. Zobell C.E. The Effect of solid surfaces upon bacterial activity // J. Bacteriol. – 1943. – V. 46 (1). – P. 39 – 56.