

На правах рукописи

Гришин Александр Владимирович

**Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA,
и рекомбинантных ферментов лизостафина и дисперсина В на биоплёнки
возбудителей оппортунистических инфекций**

Специальность 1.5.11. – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории биологически активных наноструктур Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

**Научный
руководитель:**

Карягина-Жулина Анна Станиславовна,
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ.

**Официальные
оппоненты:**

Потехина Наталья Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии микробов Биологического факультета ФГОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Плюта Владимир Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории функциональной энзимологии отдела молекулярной фармакологии и иммунологии Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий, НИЦ «Курчатовский институт».

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова).

Защита состоится 9 декабря 2024 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского по адресу: 117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН http://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii_grishin-a-v.html

Автореферат разослан « » 2024 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета**

Доктор биологических наук
Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Оппортунистические инфекции являются одной из важнейших проблем современного здравоохранения. В норме микроорганизмы, вызывающие оппортунистические инфекции, не представляют опасности. Однако при ослаблении защитных систем организма из-за предрасполагающей патологии и/или травмы, такие микроорганизмы получают возможность размножиться и запускать инфекционный процесс. Полностью избавиться от этих патогенов нельзя, поскольку они являются нормальными компонентами микробиома человека или окружающей его среды, в связи с чем всегда сохраняется риск развития оппортунистической инфекции.

Основным способом лечения оппортунистических инфекций являются антибиотики. Однако во многих случаях антибиотикотерапия оказывается неэффективной несмотря на чувствительность возбудителя инфекции к выбранному антибиотику в стандартных лабораторных тестах. Это может быть связано с образованием биоплёнок – сообществ микроорганизмов, окружённых экзополимерным матриксом (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Существовая в форме биоплёнок, бактерии проявляют большую устойчивость к неблагоприятным воздействиям среды, антибиотикам и факторам иммунной системы человека. Формирование биопленок, с одной стороны, способствует сохранению патогенных микроорганизмов в окружающей среде, а с другой стороны – помогает микроорганизмам колонизировать органы и ткани человека, а также поверхность имплантируемых материалов, что в итоге может привести к развитию рецидивирующих инфекций.

В настоящий момент значительные усилия научного сообщества сосредоточены на поиске новых средств и подходов в борьбе с бактериальными биопленками. Эти средства и подходы могут отличаться стандартных методов лечения и, как и любые лекарственные средства, должны соответствовать стандартам безопасности. Немаловажным фактором является их дешевизна и удобство применения.

Одним из определяющих свойств биоплёнок является наличие матрикса, скрепляющего бактерии внутри биоплёнки друг с другом и затрудняющего проникновение антибиотиков и клеток иммунной системы человека (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Нарушение взаимодействия компонентов матрикса друг с другом и/или с бактериальными клетками представляет собой один из подходов в борьбе с биопленками (Koo *et al.*, 2017). Матрикс биоплёнок большинства микроорганизмов содержит полисахариды, внеклеточную ДНК, специализированные белки, липиды и другие соединения. При этом полисахариды являются одним из ключевых компонентов, а их взаимодействие с клетками бактерий обеспечивается лектинами – специфическими белками, узнающими углеводный компонент в составе молекул, например полисахаридах. Для того, чтобы нарушить естественные взаимодействия полисахаридов матрикса, можно использовать агенты, блокирующие связывание

лектинов с полисахаридами. Очевидными кандидатами на роль таких молекул-блокаторов являются различные природные олиго- и полисахариды.

Важным свойством бактериальных биоплёнок является физиологическая и метаболическая гетерогенность бактериальных клеток (Stewart, Franklin, 2008). Как правило, только часть клеток в биоплёнке находится в активном состоянии и может быть элиминирована антибиотиками. Та часть клеток, которая существует в форме персистеров – метаболически неактивных клеток, проявляет толерантность к действию антибиотиков (Lewis, 2007; Urbaniec et al., 2021). Для достижения полной эрадикации биоплёнок, антибактериальные препараты должны быть эффективны как в отношении метаболически активных клеток, так и в отношении клеток-персистеров. Такими соединениями могут являться антибактериальные лизины – ферменты, расщепляющие различные химические связи в пептидогликане клеточной стенки бактерий (Oliveira et al., 2018; Pastagia et al., 2013). Как правило, антибактериальные лизины эффективны в отношении биоплёнок, хотя концентрации лизинов, которые требуются для их эрадикации, обычно превышают концентрации, необходимые для элиминации планктонных клеток. Для повышения эффективности действия лизинов перспективным представляется совместное использование лизинов и специфических белков-гликозидгидролаз, целенаправленно разрушающих полисахариды, входящие в состав матрикса биоплёнок.

В настоящее время среди основных и наиболее проблемных возбудителей оппортунистических инфекций можно выделить *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойную палочку) и *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) (Botzenhart, Döring, 1993; Lowy, 1998). Оба микроорганизма часто используют в качестве модельных объектов в исследованиях бактериальных биоплёнок. В данной работе исследовали два разных подхода в борьбе с биоплёнками: блокирование лектинов природными олиго- и полисахаридами и разрушение бактериальных клеток и полисахаридов матрикса рекомбинантными гидролазами. В первом случае в качестве модели были выбраны биоплёнки *P. aeruginosa* и лектин LecA в качестве мишени для действия галактозосодержащих олиго- и полисахаридов. Во втором случае – биоплёнки *S. aureus* и ферменты лизостафин, расщепляющий пентаглициновые мостики в пептидогликане стафилококков, и гликозидгидролаза дисперсин В, гидролизующая полисахарид PNAG матрикса.

Цель и задачи исследования

Целью работы является испытание природных олиго- и полисахаридов в качестве соединений, блокирующих функции лектина LecA, исследование их действия на биоплёнку *P. aeruginosa*, а также изучение действия комбинации ферментов лизостафина и дисперсина В на биоплёнку *S. aureus*.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать способность растительных олиго- и полисахаридов, содержащих остатки галактозы, взаимодействовать с лектином LecA.

2. Исследовать влияние олиго- и полисахаридов, показавших способность взаимодействовать с LecA, на формирование и разрушение биоплёнок *P. aeruginosa*.
3. Исследовать действие олиго- и полисахаридов, показавших эффективность в отношении биоплёнок *P. aeruginosa*, в комбинации с традиционными антибиотиками.
4. Исследовать совместное действие лизостафина и дисперсина В на биоплёнки *S. aureus* в сравнении с действием каждого из белков по-отдельности.
5. Исследовать эффективность слитного белка, состоящего из лизостафина и дисперсина В, в отношении биоплёнок *S. aureus* в сравнении с простой смесью исходных белков.
6. Исследовать возможность введения лизостафина и дисперсина В в костно-пластические материалы для придания им антибиоплёночных свойств.

Научная новизна и значимость работы

Впервые показано, что растительные олигосахариды вербаскоза, галактозил-маннотриоза и дигалактозил-маннопентаоза, а также полисахарид галактан, способны взаимодействовать с лектином LecA *P. aeruginosa*. За счет мультивалентного эффекта аффинность дигалактозил-маннопентаозы к LecA оказалась выше аффинности всех описанных в литературе олигосахаридов.

Отработан новый вариант методики культивации биоплёнок *P. aeruginosa*, в котором биоплёнки выращиваются на полипропиленовых купонах, помещённых в лунки 96-луночного планшета в вертикальной ориентации. В отличие от стандартной методики культивации биоплёнок на стенках лунок 96-луночных планшетов, биоплёнки на полипропиленовых купонах могут быть проанализированы с помощью светлорольной или флуоресцентной микроскопии. Кроме того, биоплёнка образуется на границе между воздухом и средой, что отличает эту методику от подхода, в котором биоплёнки культивируются на покровных стеклах, полностью погружённых в питательную среду.

Впервые исследовано воздействие галактана на биоплёнки *P. aeruginosa*. Показано, что при использовании в определённом диапазоне концентраций, галактан способен ингибировать образование биоплёнок *P. aeruginosa*, при этом не оказывая негативного влияния на планктонный рост бактерий, то есть обладает специфическим антибиоплёночным эффектом. Использование галактана в меньших концентрациях, напротив, приводит к стимулированию образования биоплёнки. Такой эффект не наблюдался ранее для соединений – лигандов LecA, и продемонстрирован в данной работе впервые. Кроме того, на примере галактана впервые показана способность полисахарида, не являющегося ~~нормальным~~ компонентом матрикса биоплёнок, снижать эффективность антибиотиков в отношении клеток в составе биоплёнки.

Впервые получен слитный белок, состоящий из антибактериального лизина (лизостафина) и гликозидгидролазы, расщепляющей полисахариды матрикса

биоплёнок (дисперсин В). Показана более высокая эффективность такого белка в отношении биоплёнок *S. aureus* по сравнению с простой смесью исходных белков несмотря на сниженную бактериолитическую активность слитного белка по сравнению с нативным лизостафином.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в первую очередь в описании новых, не наблюдавшихся ранее эффектов, оказываемых полисахаридами на бактериальные биоплёнки. В большей части работ, описывающих подавление образования биоплёнок или их разрушение полисахаридами, не изучается их совместное действие с антибиотиками. Описанные в данной работе эффекты показывают сложный характер взаимодействия полисахаридов с биоплёнками и демонстрируют, что даже способность к разрушению биоплёнок не гарантирует, что полисахарид будет способствовать повышению их чувствительности к антибиотикам. Кроме того, была отработана модель культивирования биоплёнок *P. aeruginosa* на полипропиленовых купонах, помещаемых в лунки культуральных планшетов в вертикальной ориентации. Эта модель хорошо подходит для микроорганизмов, формирующих биоплёнку на границе между воздухом и культуральной средой, и удобна как для исследования структуры биоплёнок с помощью обычной и флуоресцентной микроскопии, так и для подсчета количества жизнеспособных клеток внутри биоплёнки. Также показано, что комбинация двух разных активностей – бактериолитической активности лизостафина и гликозидгидролазной активности дисперсин В – в составе одного слитного белка повышает эффективность такого белка в отношении биоплёнок *S. aureus*. Эти данные могут быть использованы при разработке средств для борьбы с биоплёнками на основе белков-ферментов. Кроме того, показана возможность адсорбции лизостафина на частицах керамики диоксида, что может быть использовано при разработке костно-пластических материалов с антибактериальными и антибиопрленочными свойствами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Растительные полисахариды способны взаимодействовать с лектином LecA *P. aeruginosa*. В ходе взаимодействия одна молекула дигалактозил-маннопентаозы связывает две молекулы LecA одновременно, за счет чего её аффинность к LecA превышает аффинность всех исследованных олигосахаридов.
2. Полисахарид галактан подавляет формирование биоплёнок *P. aeruginosa*, частично разрушает или изменяет морфологию зрелых биоплёнок, а также защищает бактерии внутри биоплёнки от действия некоторых антибиотиков.
3. Соединения, связывающиеся с лектином LecA, способны не только подавлять, но и стимулировать образование биоплёнок *P. aeruginosa* при их применении в определенном диапазоне концентраций.

4. Слитный белок, состоящий из антибактериального лизина лизостафина и дисперсина В, гидролизующего полисахариды матрикса биоплёнок, более эффективен по сравнению с простой смесью исходных ферментов.

5. Лизостафин может быть адсорбирован на материалы для костной пластики, в частности на кальций-магниевую силикатную керамику диопсид, для придания им антибактериальных и антибиоплёночных свойств.

Апробация работы

Основные результаты были представлены на международной конференции The 2nd Conference on Natural Health (26-28 октября 2014 г., Алжир), международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2015» (13-17 апреля 2017 г., Москва, Россия), международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (20-22 февраля 2017 г., и 25-27 февраля 2019 г., Москва, Россия) и объединённом научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (3-8 октября 2021 г., Сочи, Россия).

Публикации

Материалы работы содержатся в 10 печатных работах: 5 научных статьях в рецензируемых журналах и 5 тезисах конференций.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнены работы, включающие изучение взаимодействия олигосахаридов с лектином LecA с помощью титрационной калориметрии, наработку и выделение рекомбинантных белков лизостафина, дисперсина В и Lst-DspB, определение их ферментативной и бактериолитической активности (включая отработку методик), отработку условий иммуноферментного анализа лизостафина, отработку условий культивации бактериальных биоплёнок (включая отработку описанных в литературе методик и разработку их модифицированных вариантов) и изучение действия на биоплёнки олиго- и полисахаридов, антибиотиков и рекомбинантных белков, анализ биоплёнок с помощью микроскопии (включая обработку изображений) и статистический анализ результатов. Кроме того, автором лично подготовлены публикации по материалам исследования.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 197 страницах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы (303 источника). Работа содержит 6 таблиц и 52 рисунка.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в лаборатории биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ с 2012 по 2024 годы.

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи д.м.н. Большаковой Т. Н., к.б.н. Добрыниной О. Ю., к.б.н. Лящуку А. М., к.б.н. Лавровой Н. В., д.б.н. Бокше И. С., к.б.н.

Галушкиной З. М., к.б.н. Кудиновой А. Г., Груниной Т. М. и Попоновой М. С. за участие в работах, связанных с получением генетических конструкций, наработкой и выделением рекомбинантного LecA, исследованием его взаимодействия методом ингибирования гемагглютинации, изучением связывания рекомбинантных белков с порошком диоксида и их высвобождения. Также автор благодарит сотрудников лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов к.б.н. Тиганову И. Г., к.б.н. Алексееву Н. В. и к.б.н. Степанову Т. В. за участие в проведении первичного скрининга действия различных полисахаридов на биоплёнку *P. aeruginosa* 216. Кроме того, автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. проф. Карягиной А. С. и руководителю лаборатории биологически активных наноструктур Лунину В. Г. за помощь на всех этапах выполнения работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и реактивы. В работе использовали коллекционный штамм *P. aeruginosa* PAO1, клинический изолят *P. aeruginosa* 216, выделенный от больного муковисцидозом сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (заведующий лабораторией проф. И.А. Шагинян), и коллекционный штамм *S. aureus* ATCC 29213. Олиго- и полисахариды были приобретены в Megazyme Inc. (Брей, Ирландия), за исключением ламинарина *Laminaria digitata*, приобретённого в Sigma (Сент-Луис, США).

Клонирование, наработка и выделение рекомбинантного LecA. Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность LecA (UniProt Q05097), была синтезирована компанией Евроген (Москва, Россия) и клонирована в плазмиду pQE13 стандартными методами. Полученная плазида была трансформирована в клетки *E. coli* M15[pREP4] с помощью электропорации. Для наработки белка штамм-продуцент выращивали в среде LB, синтез белка индуцировали добавлением 0.5 мМ ИПТГ. Тельца включения, содержащие рекомбинантный белок LecA, растворяли в 8 М мочеvine, очищали на сорбенте Workbeads 40 Ni и диализовали против 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5.

Гемагглютинация. Суспензию человеческих эритроцитов, обработанных папаином и цистеином, смешивали с раствором LecA или конканавалина А (контроль гемагглютинации) и раствором исследуемого вещества (олиго- или полисахарида) и инкубировали в течение 2-х часов при 37°C в круглодонных 96-луночных планшетах.

Изотермальная титрационная калориметрия (ИТС). Эксперименты проводили на приборе iTC200 (GE Healthcare, США) при температуре +30°C и перемешивании со скоростью 300 об./мин. Рекомбинантный белок LecA в концентрации 278 мкМ добавляли в ячейку и титровали раствором лиганда (ИПТГ, 2.1 мМ; вербаскоза, 3 мМ; галактозил-маннотриоза, 4 мМ или дигалактозил-маннопентаоза, 1 мМ).

Культивирование, ингибирование и разрушение биоплёнок *P. aeruginosa* в 96-луночных планшетах. Для первоначального скринингового теста полисахаридов биоплёнки *P. aeruginosa* 216 культивировали в 96-луночных планшетах в среде LB в течение 5 ч при 37°C в присутствии полисахаридов, после чего планктонные клетки удаляли, а биоплёнки окрашивали кристаллическим фиолетовым.

В остальных экспериментах биоплёнки *P. aeruginosa* культивировали в 96-луночных планшетах в среде М63 (3 г/л KH_2PO_4 , 7 г/л K_2HPO_4 , 2 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) с добавлением 1 mM MgSO_4 , 0.2% глюкозы и 0.5% казаминовых кислот. Для определения ингибирующего действия галактана биоплёнки культивировали в присутствии галактана в течение 24-х часов при 36°C, после чего отмывали от планктонных клеток и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Для определения влияния галактана на сформированные биоплёнки *P. aeruginosa* биоплёнки культивировали в 96-луночных планшетах в течение 24-х часов, отмывали от планктонных клеток, после чего к биоплёнкам добавляли свежую среду, содержащую галактан, и биоплёнки инкубировали в течение ещё 24-х часов.

Культивирование, ингибирование и разрушение биоплёнок *P. aeruginosa* на полипропиленовых купонах. Купоны размером $\sim 10.0 \times 6.5$ мм вырезали из листа полипропилена толщиной 0.5 мм (Trans G03, Carolex, Лонге-Жумель, Франция) и помещали вертикально в лунки 96-луночных планшетов, содержащих суспензию бактерий *P. aeruginosa*, после чего биоплёнки культивировали аналогично биоплёнкам в лунках 96-луночных планшетов.

Определение влияния полисахаридов на планктонный рост *P. aeruginosa*. Бактерии *P. aeruginosa* в среде М63 в концентрации $\sim 5 \times 10^6$ КОЕ/мл с добавлением или без добавления галактана инкубировали при 36°C и 400 об./мин. Через 0, 4, 6 и 8 часов измеряли оптическая плотность суспензии бактерий, а также определяли количество жизнеспособных бактерий с помощью посева на агаризованную питательную среду.

Определение МИК и МБК. МИК (минимальная ингибирующая концентрация) и МБК (минимальная бактерицидная концентрация) определяли в 96-луночных планшетах в среде М63 с добавлением 1 mM MgSO_4 , 0.2% глюкозы и 0.5% казаминовых кислот стандартным образом.

Определение МКЭБ. Для определения МКЭБ (минимальной концентрации антибиотиков, необходимой для эрадикации биоплёнок) биоплёнки *P. aeruginosa* культивировали в 96-луночных планшетах, промывали от планктонных клеток и инкубировали в среде М63 с добавлением серийных разведений антибиотиков в течение 24-х часов. После этого биоплёнки снова промывали, лунки планшета заполняли питательной средой Difco nutrient broth и планшет снова инкубировали в течение 24-х часов. За МКЭБ принимали минимальную концентрацию антибиотика, после применения которой не наблюдалось возобновление бактериального роста.

Определение количества жизнеспособных клеток в биоплёнках *P. aeruginosa*. Полипропиленовые купоны с биоплёнками помещали в микроцентрифужные пробирки, содержащие стеклянные шарики Ø0.6-0.8 мм и среду М63 (для биоплёнок PAO1) или PBS (для биоплёнок изолята 216), кратко вортексировали и количество жизнеспособных бактерий определяли с помощью посева на агаризованную питательную среду и подсчета колоний.

Флуоресцентная микроскопия. Для флуоресцентной микроскопии использовали микроскоп EVOS FLoid cell imaging station (ThermoFischer Scientific) и красители FilmTracer LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit (Molecular Probes Inc., Юджин, США). Обработка изображений производили в программе Fiji.

Клонирование, наработка и очистка лизостафина, дисперсина В, Lst-DspВ. Нуклеотидные последовательности лизостафина (Uniprot P10547, а.о. 248-493) и дисперсина В (Uniprot Q840G9_AGGAC, а.о. 20-334) были оптимизированы, синтезированы и клонированы аналогично гену *lecA*. Ген Lst-DspВ был получен последовательным слиянием генов, кодирующих лизостафин, короткий глицин-сериновый спейсер и дисперсин В, с использованием стандартных генно-инженерных методик. Лизостафин и Lst-DspВ были очищены с помощью катионообменной хроматографии на сорбенте WorkBeads 40S (Bio-works, Швеция), дисперсин В был очищен с помощью металл-хелатной хроматографии на сорбенте WorkBeads Ni-NTA (Bio-works, Швеция).

Определение пептидазной активности лизостафина и Lst-DspВ. Пептидазная активность лизостафина и Lst-DspВ была оценена по скорости расщепления пентаглицинового пептида (sc-471644A, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США). Степень гидролиза пентаглицина определяли при помощи хромогенной реакции свободных аминокетильных групп с нингидрином (Grishin *et al.*, 2020).

Определение гликозидгидролазной активности дисперсина В и Lst-DspВ. Гликозидгидролазная активность дисперсина В определяли по скорости гидролиза *p*-нитрофенил N-ацетил-β-D-глюкозаминида (N9376, Sigma-Aldrich, США) с образованием *p*-нитрофенола, количество которого определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм (Kaplan *et al.*, 2003).

Определение бактериолитической активности лизостафина и Lst-DspВ. Бактериолитическая активность лизостафина и Lst-DspВ определяли по скорости просветления суспензии бактериальных клеток (Grishin *et al.*, 2020). Клетки *S. aureus* ATCC 29213 в растворе 20 мМ HEPES, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% BSA доводили до мутности, соответствующей 4.0 по МакФарланду и смешивали с разными концентрациями исследуемых белков, после чего измеряли оптическую плотность при 550 нм каждую минуту с помощью планшетного ридера Multiscan FC (Thermo Scientific, США). За скорость просветления суспензии принимали наклон кривой зависимости оптической плотности от времени в точке перегиба.

Определение МИК лизостафина, Lst-DspB и диопсида. МИК лизостафина, дисперсина В и диопсида с сорбированным на нем лизостафином в отношении *S. aureus* ATCC 29213 определяли в 96-луночных планшетах в среде Мюллер-Хинтон (BD, США) с добавлением 2% NaCl и 0.1% BSA стандартным образом.

Культивация и разрушение биоплёнок *S. aureus*. Биоплёнки *S. aureus* ATCC 29213 культивировали в лунках 96-луночных планшетов в среде TSB с добавлением 1% глюкозы и 2% NaCl, с добавлением или без добавления 1.5% инактивированной гепаринизированной крысиной плазмы крови в течение 24-х часов. Для определения антибиоплёночного действия исследуемых белков биоплёнки промывали от планктонных клеток и инкубировали в течение 2 часов в растворе разных концентраций белков в TBS. Количество сохранившейся биоплёнки определяли с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Для оценки антибиоплёночной активности диопсида биоплёнки культивировали и обрабатывали аналогичным образом, но с использованием 24-х луночных планшетов и увеличенным временем обработки (24 ч вместо 2 ч). Кроме того, диопсид помещали в специальные вкладыши для планшетов SPLInsert 24-well (SPL, Республика Корея) с мембранным дном с диаметром пор 3 мкм чтобы предотвратить его прямой контакт с биоплёнкой.

Адсорбция белков на диопсид. Порошок диопсида, предоставленный сотрудниками НИТУ МИСиС (Карягина и др., 2022), промывали в растворе 10 мМ Трис, pH 7.5, после чего к нему добавляли лизостафин или дисперсин В в количестве 100 мкг белка в 250 мкл раствора 10 мМ Трис, pH 7.5, смесь инкубировали в течение 2 часов, диопсид отделяли от раствора центрифугированием и снова промывали. Супернатант после инкубации с белками и промывки, содержащий не связавшийся белок, отбирали для определения концентрации по методу Брэдфорда, а также для анализа в полиакриламидном гель-электрофорезе.

Кинетика выхода белков с диопсида. Порошок диопсида с адсорбированными на нем белками инкубировали в PBS с добавлением 1 мг/мл BSA при 37°C с постоянным перемешиванием. Пробы для анализа отбирали через 0, 1, 3, 5, 24, 48 и 72 часа.

Иммуноферментный анализ. Для определения концентрации лизостафина, вышедшего с диопсида, использовали сендвич-ИФА с поликлональными кроличьими антителами к лизостафину в качестве иммобилизованных антител и моноклональными антителами к лизостафину (клон 2F9, ФГБУ Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия) в качестве детектирующих антител.

Оценка антибактериальной активности лизостафина по зонам лизиса. Для оценки антибактериальной активности лизостафина, вышедшего с диопсида, суспензию клеток *S. aureus* ATCC 29213 наносили на чашки Петри с агаризованной средой Мюллера-Хинтона II (BD, США), после чего на поверхность среды наносили по 10 мкл образцов, содержащих лизостафин. Активность лизостафина определяли по отсутствию бактериального роста в месте нанесения образца.

Статистический анализ. Статистический анализ результатов проводили в программе Microsoft Excel с использованием дополнения Real Statistics Resource Pack Excel add-on.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Клонирование, наработка и выделение LecA

Последовательность гена, кодирующего белок LecA, была оптимизирована с учетом частоты кодонов и вторичной структуры мРНК. Синтезированная последовательность была клонирована в плазмиду pQE13 с добавлением гексагистидинового тага. Рекомбинантный белок был синтезирован в клетках *E. coli* и очищен с помощью металло-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях с последующим рефолдингом.

2. Тестирование олигосахаридов на способность связываться с LecA

В качестве олигосахаридных блокаторов LecA были испытаны три коммерчески доступных растительных олигосахарида: β^1 - α -D-галактозил-маннотриоза, β^3, β^4 - α -D-дигалактозил-маннопентаоза и вербаскоза. Первые два олигосахарида представляют собой продукты ферментативного гидролиза галактоманнана рожкового дерева разной длины, состоящие из остатков маннозы и галактозы. Вербаскоза представляет собой линейный пентасахарид, синтезируемый различными бобовыми растениями, и состоит из трёх остатков галактозы, одного остатка глюкозы и одного остатка фруктозы.

Взаимодействие олигосахаридов с рекомбинантным LecA было исследовано с помощью определения степени ингибирования гемагглютинации, вызванной LecA, а также изотермальной титрационной калориметрии (ИТС). Оба подхода показали, что все три олигосахарида способны взаимодействовать с LecA более эффективно, чем контрольный моносахарид галактоза. При этом дигалактозил-маннопентаоза продемонстрировала наиболее высокую среди всех описанных в литературе олигосахаридов аффинность к LecA (K_D 4.1 мкМ), а также способность связывать две молекулы LecA одновременно, предположительно за счет наличия двух концевых остатков галактозы.

3. Тестирование олигосахаридов на способность подавлять образование биоплёнок *P. aeruginosa*

Поскольку дигалактозил-маннопентаоза показала наибольшую аффинность к LecA, было исследовано её действие на биоплёнки двух штаммов *P. aeruginosa* (коллекционный PAO1 и клинический изолят 216) при их культивации в лунках 96-луночных планшетов. Дигалактозил-маннопентаоза оказалась не способна снизить количество биомассы в биоплёнках даже при использовании в концентрации 0.2% (~1.7 мМ). Напротив, добавление этого олигосахарида привело к небольшому увеличению количества биомассы. Таким образом, несмотря на высокую аффинность

к LecA, дигалактозил-маннопентаоза не является ингибитором образования биоплёнок *P. aeruginosa*.

4. Тестирование полисахаридов на способность связываться с LecA

В качестве полисахаридных блокаторов LecA были испытаны галактан и рамногалактоуронан картофеля, галактоманнан гуара, арабиногалактан лиственницы, а также глюкоманнан *Amorphophallus konjac*, глюканы ячменя и ламинарии (ламинарин) в качестве контрольных полисахаридов, не содержащих остатки галактозы. Галактан и галактоманнан ингибировали гемагглютинацию, вызываемую LecA, по всей видимости за счет специфического взаимодействия с LecA. Глюкан ламинарин не оказывал никакого влияния. Остальные полисахариды сами приводили к агглютинации эритроцитов, а рамногалактоуронан картофеля вызывал гемолиз.

5. Тестирование полисахаридов на способность подавлять образование биоплёнок *P. aeruginosa*

Все полисахариды были протестированы на способность подавлять биоплёнки изолята *P. aeruginosa* 216. Галактан картофеля обладал наиболее выраженным эффектом и практически полностью подавлял формирование биоплёнок *P. aeruginosa* 216 за 5 часов (рис. 1), в связи с чем был выбран для дальнейшего изучения.

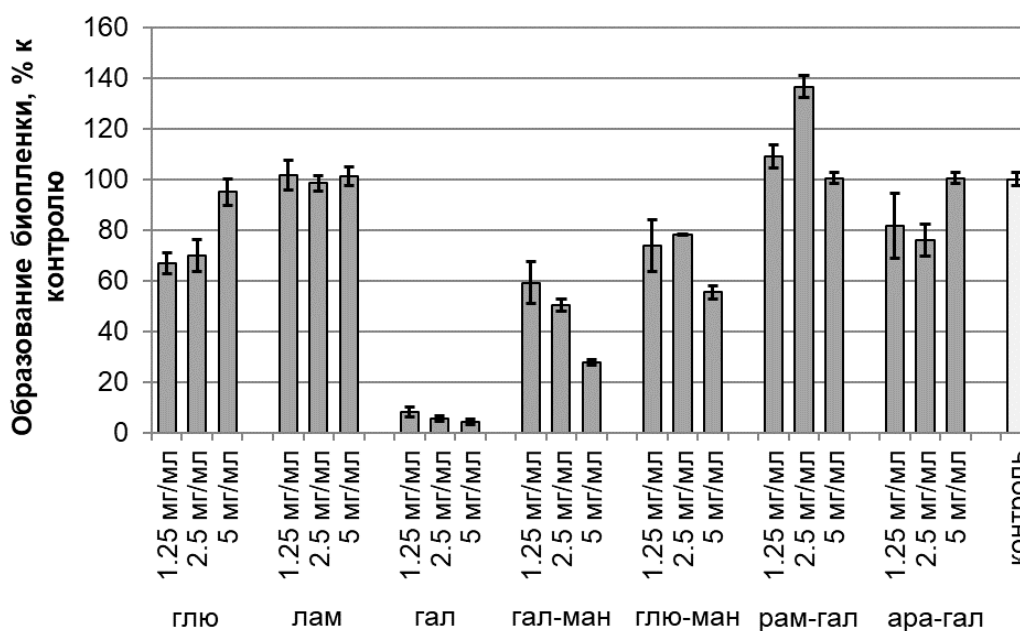


Рисунок 1. Образование биоплёнок изолятом *P. aeruginosa* 216 в 96-луночных планшетах в присутствии различных полисахаридов (окраска кристаллическим фиолетовым). «Глю» – глюкан ячменя, «лам» – ламинарин, «гал» – галактан картофеля, «гал-ман» – галактоманнан гуара, «глю-ман» – глюкоманнан *A. konjac*, «рам-гал» – рамногалактоуронан картофеля, «ара-гал» – арабиногалактан лиственницы, контроль – биоплёнка без добавления полисахаридов.

6. Детальное исследование влияния галактана на биоплёнки *P. aeruginosa*

Эффект подавления образования биоплёнок *P. aeruginosa* галактаном был воспроизведен на коллекционном штамме *P. aeruginosa* PAO1 (рис. 2). Минимальной концентрацией галактана, подавляющей образование биоплёнок обоих использованных штаммов, оказалась концентрация 1 мг/мл (0.1%) (рис. 3). Интересно,

что при концентрации 0.1 мг/мл напротив, был отмечен выраженный прирост биомассы биоплёнок обоих штаммов по сравнению с контролем (рис. 3).

Полимерная структура галактана оказалась важна для ингибирования формирования биоплёнок, поскольку мономерная галактоза в эквивалентной концентрации (1 мг/мл) не оказывала влияния на биоплёнки обоих штаммов.

Для того, чтобы исследовать влияние галактана на биоплёнки *P. aeruginosa* с помощью микроскопии, был отработан метод культивации биоплёнок на полипропиленовых купонах, помещённых в лунки 96-луночных планшетов (рис. 4). Кроме того, биоплёнки, культивированные на полипропиленовых купонах, можно снять с купона и разрушить с помощью обработки стеклянными шариками, после чего определить количество жизнеспособных бактерий за счет посева на твердую питательную среду.

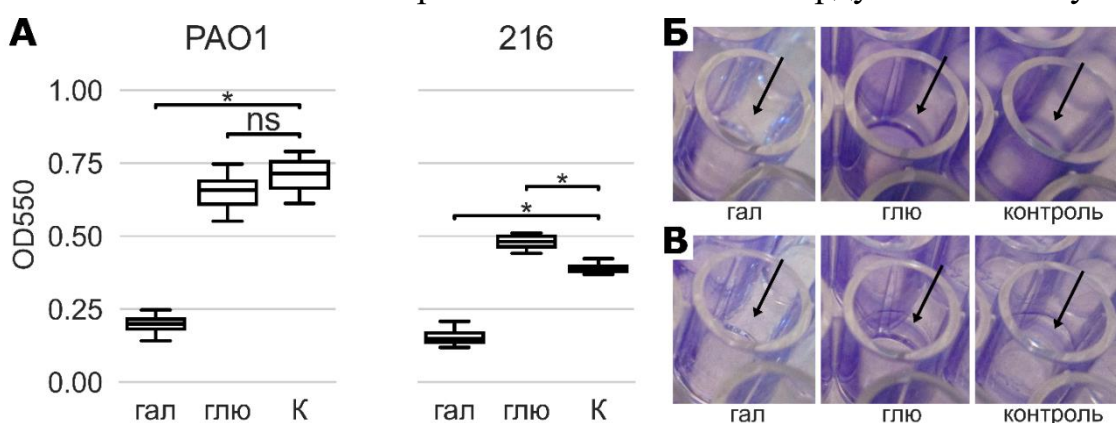


Рисунок 2. Образование биоплёнок штаммами *P. aeruginosa* PAO1 и 216 в 96-луночных планшетах в присутствии полисахаридов галактана и глюкана (окраска кристаллическим фиолетовым). А – количество связавшегося с биоплёнками красителя; «гал» – 1 мг/мл галактана, «глю» – 1 мг/мл глюкана, «К» – контроль без полисахарида. Б, В – фотографии биоплёнок PAO1 (Б) и изолята 216 (В) в лунках 96-луночных планшетов; биоплёнки отмечены стрелками. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

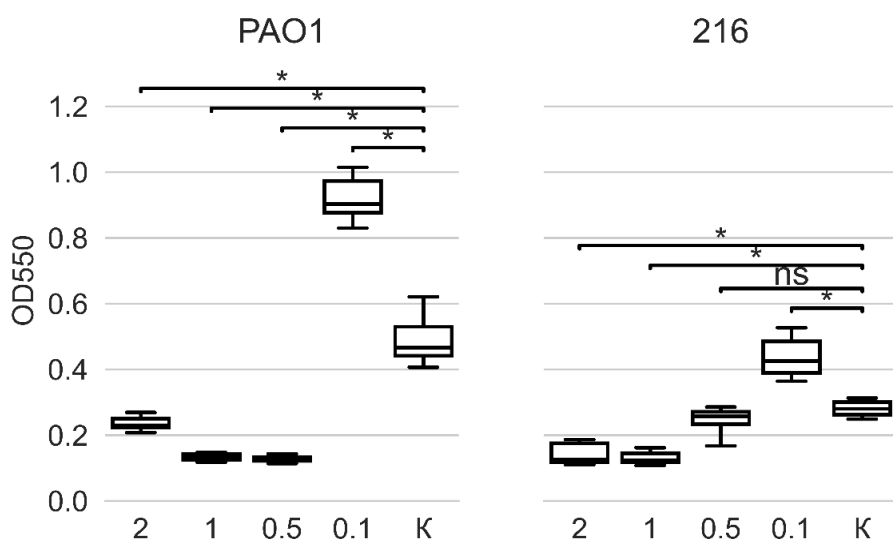


Рисунок 3. Образование биоплёнок штаммами *P. aeruginosa* PAO1 и 216 в 96-луночных планшетах в присутствии разных концентраций галактана (окраска кристаллическим фиолетовым). 2 – 2 мг/мл, 1 – 1 мг/мл, 0.5 – 0.5 мг/мл, 0.1 – 0.1 мг/мл галактана, «К» – контроль без добавления галактана. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

Для того, чтобы исследовать влияние галактана на биоплёнки *P. aeruginosa* с помощью микроскопии, был отработан метод культивации биоплёнок на полипропиленовых купонах, помещённых в лунки 96-луночных планшетов (рис. 4). Кроме того, биоплёнки, культивированные на полипропиленовых купонах, можно снять с купона и разрушить с помощью обработки стеклянными шариками, после чего определить количество жизнеспособных бактерий за счет посева на твердую питательную среду. При визуальном анализе видно, что галактан ингибирует формирование биоплёнок на полипропиленовых купонах аналогично биоплёнкам в лунках 96-луночных планшетов (рис. 4). При этом микроскопия таких биоплёнок показала, что галактан не препятствует адгезии бактерий на полипропилене, однако предотвращает рост биоплёнки и накопление биомассы обоими штаммами *P. aeruginosa* (рис. 4).

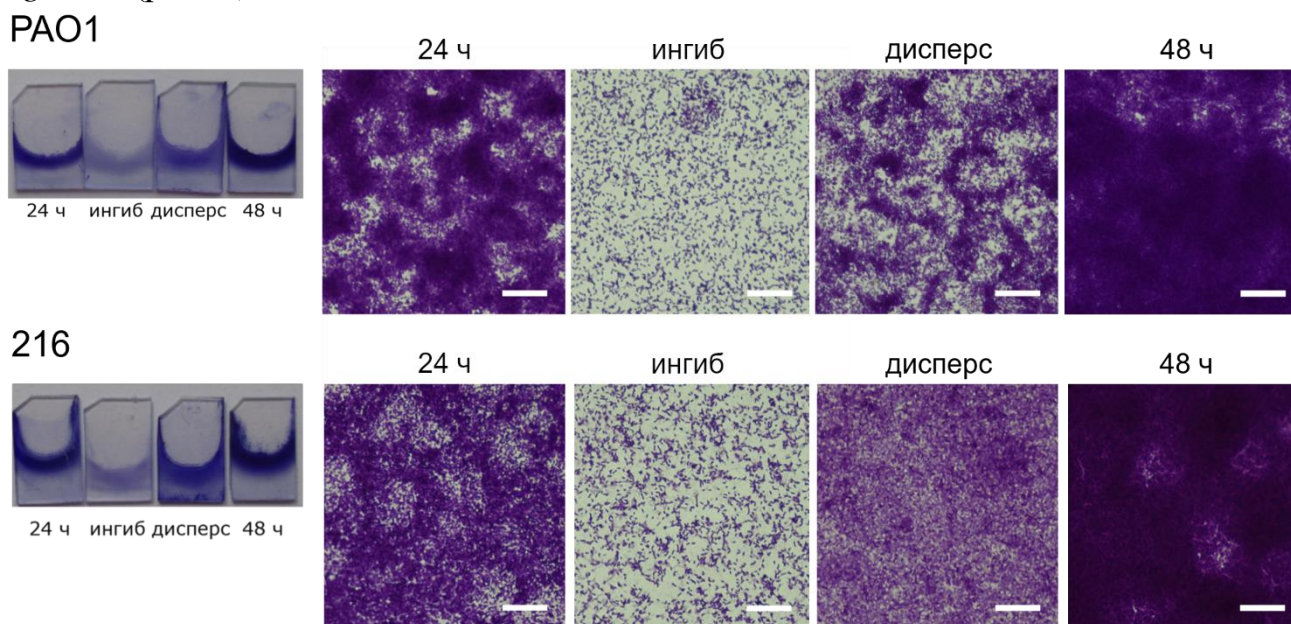


Рисунок 4. Ингибирование образования биоплёнок галактаном и воздействие галактана на сформированные биоплёнки штаммов *P. aeruginosa* PAO1 и 216 на полипропиленовых купонах. Слева – макрофотографии полипропиленовых купонов с биоплёнкой («24 ч» – контрольная 24-х часовая биоплёнка; «ингиб» – 24-х часовая биоплёнка, культивированная в присутствии 1 мг/мл галактана; «дисперс» – 24-часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная 24 часа в присутствии 1 мг/мл галактана; «48 ч» – контрольная 48-ми часовая биоплёнка). Справа – микрофотографии тех же купонов. Размер линейки соответствует 25 мкм.

Для того, чтобы проверить способность галактана разрушать сформированные биоплёнки, биоплёнки *P. aeruginosa* культивировали в течение суток, отмывали от планктонных клеток и заново инкубировали в свежей среде с добавлением галактана. В такой экспериментальной системе наблюдались различия между штаммами. Галактан частично разрушал биоплёнки, сформированные PAO1 без принципиального изменения их морфологии. Количество биомассы и жизнеспособных клеток в биоплёнках изолята 216 не изменялось после обработки галактаном, однако такие биоплёнки полностью утрачивали свою характерную морфологию и превращались в относительно равномерный слой биомассы (рис. 4,5).

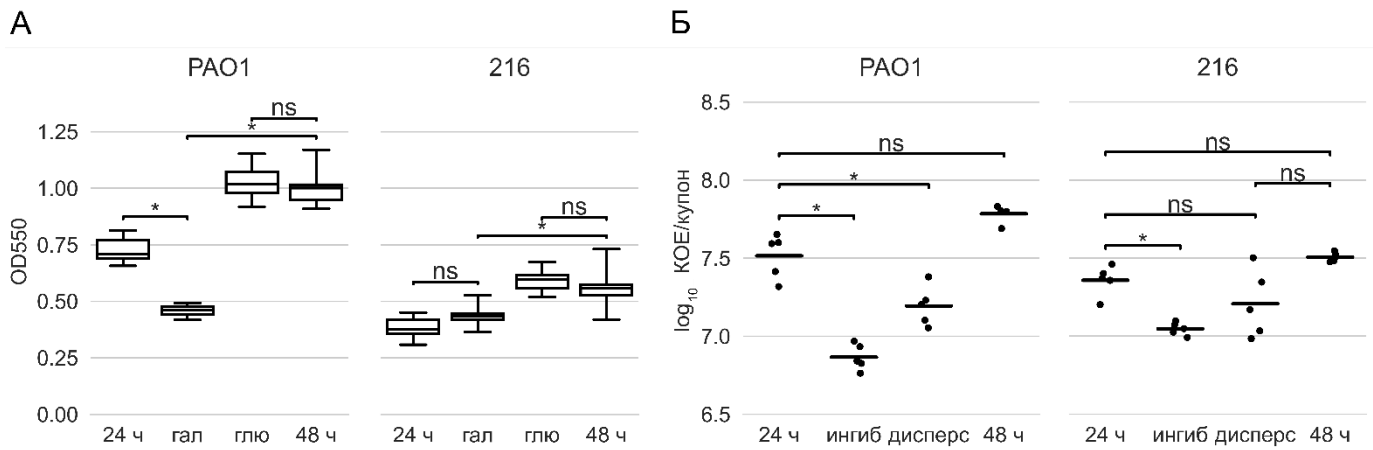


Рисунок 5. Воздействие галактана на сформированные биоплёнки штаммов *P. aeruginosa* PAO1 и 216 и влияние галактана на количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках. А – влияние галактана на количество биомассы в сформированных биоплёнках (окраска кристаллическим фиолетовым) («24 ч» – контрольная биоплёнка, сформированная в течение 24 ч; «гал» – 24-х часовая биоплёнка, обработанная 1 мг/мл галактана в течение 24 ч; «глю» – 24-х часовая биоплёнка, обработанная 1 мг/мл глюкозы в течение 24 ч; «48 ч» – 24-х часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная в течение 24 ч без полисахаридов). Б – количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках, сформированных на полипропиленовых купонах («24 ч» – контрольная 24-х часовая биоплёнка; «ингиб» – 24-х часовая биоплёнка, культивируемая в присутствии 1 мг/мл галактана; «дисперс» – 24-часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная 24 часа в присутствии 1 мг/мл галактана; «48 ч» – контрольная 48-ми часовая биоплёнка. * – статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

7. Влияние галактана на планктонный рост *P. aeruginosa*

Для того, чтобы проверить, не вызывает ли галактан прямой бактерицидный или бактериостатический эффект, было исследовано влияние галактана на скорость планктонного роста *P. aeruginosa*. Для этого *P. aeruginosa* PAO1 и изолят 216 были культивированы в 96-луночных планшетах в присутствии галактана, глюкозы или без добавления полисахаридов, и через определённые промежутки времени была определена оптическая плотность культуры и подсчитано количество КОЕ/мл с помощью посева содержимого лунок на агаризованную питательную среду. Наличие в среде галактана приводило к существенно более быстрому росту оптической плотности по сравнению с глюкозой или контролем без полисахаридов, а также к большему итоговому значению оптической плотности. При этом подсчет КОЕ/мл не показал существенной разницы в скорости планктонного роста между вариантами с галактаном, глюкозой и без добавления полисахаридов. Предположительно, увеличение оптической плотности при культивации *P. aeruginosa* в присутствии галактана объясняется избыточной агрегацией бактериальных клеток. Действительно, при культивации *P. aeruginosa* в присутствии галактана было замечено наличие видимых невооружённым глазом слизистых агрегатов. Кроме того, после кратковременного вортексирования оптическая плотность контрольной суспензии бактерий и суспензии, культивированной в присутствии галактана, оказывается практически одинаковой, вероятно, за счет разрушения бактериальных агрегатов при вортексировании. Очевидно, что, вне зависимости от причин изменения оптической

плотности бактериальной суспензии при культивации в присутствии галактана, галактан не обладает прямым бактерицидным действием и не подавляет размножение бактерий.

8. Тестирование совместного действия антибиотиков и галактана на биоплёнки *P. aeruginosa*

Поскольку галактан не обладает прямым бактерицидным эффектом, было изучено действие галактана на биоплёнки *P. aeruginosa* при совместном применении с антибиотиками. Было использовано три применяемых в клинической практике антибиотика, относящихся к разным классам и действующим на разные бактериальные мишени: цефалоспорин цефтазидим, фторхинолон ципрофлоксацин и аминогликозид амикацин.

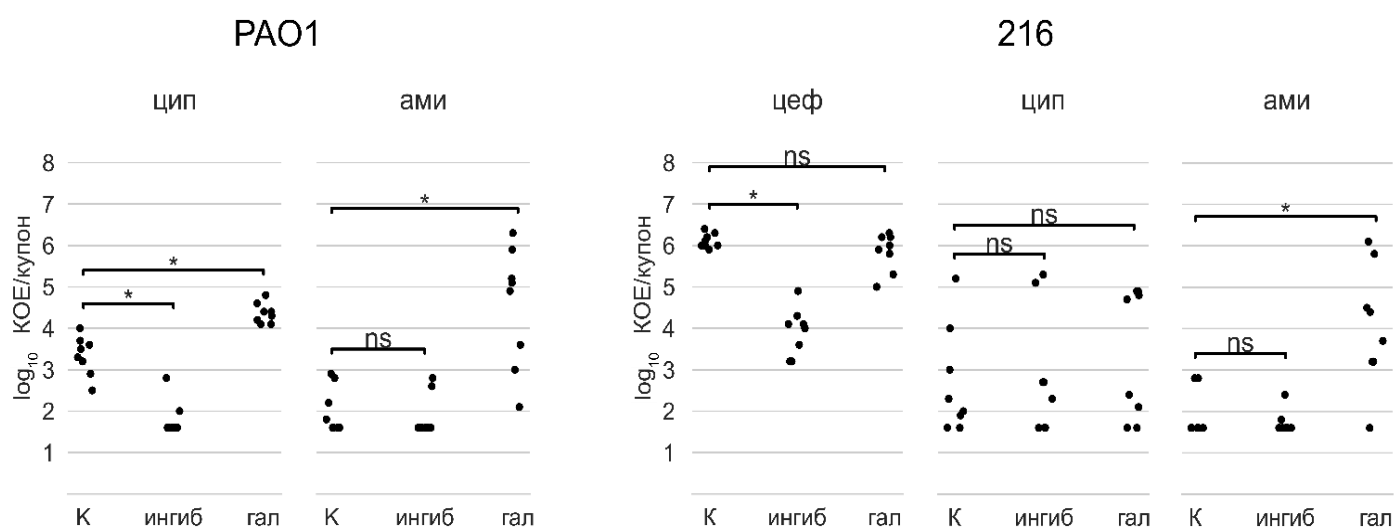


Рисунок 6. Количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках штаммов *P. aeruginosa* PAO1 и 216 после обработки антибиотиками или антибиотиками с галактаном. «Цеф» – 4*МБК цефтазидима, «цип» – 4*МБК ципрофлоксацина, «ами» – 256 мкг/мл амикацина; «К» – контрольные биоплёнки, культивированные в течение 24 ч и обработанные антибиотиком в течение ещё 24 ч часов; «ингиб» – биоплёнки, культивированные в присутствии 1 мг/мл галактана («ингибированные» биоплёнки) и обработанные антибиотиком; «гал» – биоплёнки, культивированные без добавления галактана, но обработанные антибиотиком в сочетании с 1 мг/мл галактана. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

Для этих антибиотиков были определены минимальные концентрации эрадикации биоплёнок (МКЭБ) в отношении биоплёнок обоих штаммов, за исключением комбинации PAO1/цефтазидим, поскольку цефтазидим проявлял «эффект инокулюма» в отношении этого штамма, то есть обладал разным значением МИК в зависимости от исходной концентрации бактерий. Цефтазидим и ципрофлоксацин оказались не способны полностью подавить жизнеспособность биоплёнок ни одного из штаммов. Амикацин приводил к эрадикации биоплёнок PAO1 в концентрации 128 мкг/мл, а изолята 216 – в концентрации 256 мкг/мл. Галактан не влиял на МКЭБ антибиотиков ни при совместном (инкубация биоплёнки в растворе, содержащем галактан и антибиотик), ни при последовательном (культивация биоплёнки в присутствии галактана с последующей инкубацией в растворе антибиотика) применении. В

некоторых случаях, однако, галактан изменял количество жизнеспособных клеток в биоплёнке после её обработки антибиотиками (рис. 6). При последовательном применении биоплёнки PAO1, культивируемые в присутствии галактана, оказались более чувствительны к ципрофлоксацину, а биоплёнки изолята 216 – к цефтазидиму. При совместном применении наблюдалась обратная картина: галактан либо не оказывал заметного влияния, либо способствовал увеличению количества жизнеспособных бактерий в биоплёнке, в особенности при использовании амикацина (рис. 6).

Чтобы проверить этот эффект с помощью другой методики, биоплёнки PAO1 были обработаны амикацином и исследованы под флуоресцентным микроскопом с окраской красителями LIVE/DEAD. При обработке биоплёнок амикацином в сочетании с галактаном значительно большее количество бактерий окрашивается зелёным, а значит сохраняют интактные мембраны и могут считаться жизнеспособными, по сравнению с биоплёнками, обработанными только амикацином (рис. 7). Таким образом, галактан каким-то образом предотвращает гибель бактерий под действием амикацина.

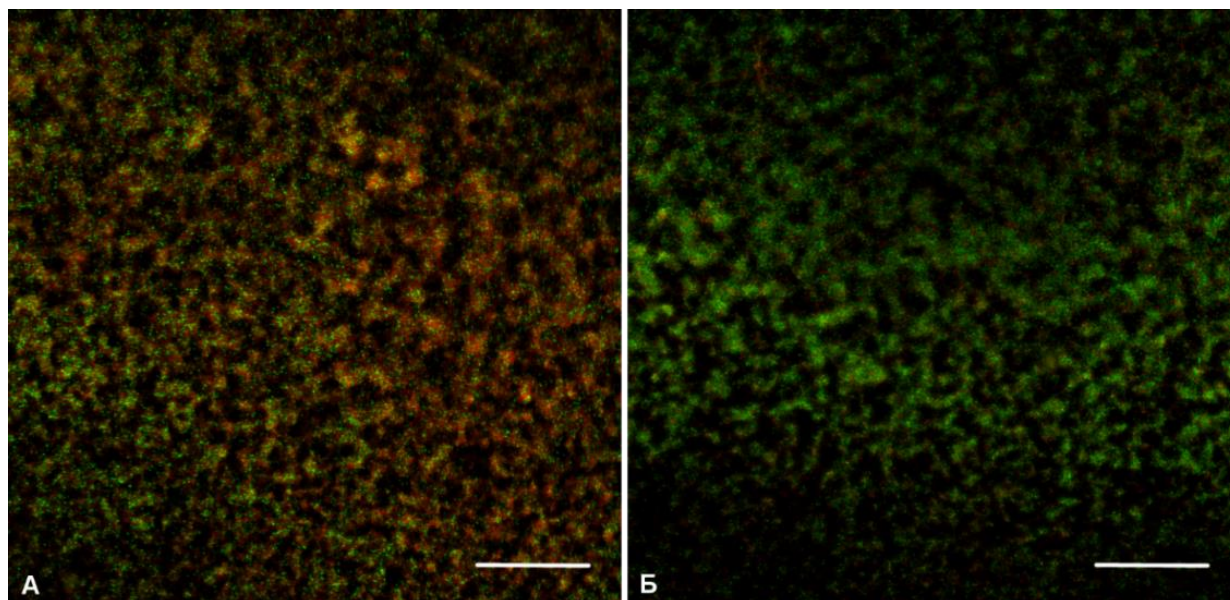


Рисунок 7. Биоплёнка *P. aeruginosa* PAO1, обработанная 256 мкг/мл амикацина (А) или 256 мкг/мл амикацина с 1 мг/мл галактана (Б), окрашенная красителями LIVE/DEAD и визуализированная с помощью флуоресцентной микроскопии. Размер линейки соответствует 100 мкм.

9. Возобновление роста биоплёнки, обработанной амикацином, с помощью фосфатов, физического разрушения или галактана

Результаты флуоресцентной микроскопии показывают наличие существенного количества живых бактерий в биоплёнках PAO1 после их обработки амикацином. При этом биоплёнки PAO1, обработанные амикацином и помещённые в свежую питательную среду, не способны возобновить рост. По-видимому, после обработки амикацином внутри биоплёнок остаются живые бактерии, которые, однако, находятся в дормантном или некультивируемом состоянии (Liu *et al.*, 2023). Чтобы проверить эту

гипотезу, биоплёнки PAO1, обработанные амикацином, были 1) инкубированы в питательной среде с добавлением PBS; 2) разрушены в свежей питательной среде без добавления PBS или 3) инкубированы в питательной среде с добавлением галактана. Оказалось, что все три варианта способствуют возобновлению роста dormantных бактерий. По-видимому, вывести бактерии в биоплёнках из dormantного состояния, вызванного обработкой амикацином, можно инкубацией в среде с достаточной концентрацией фосфатов либо разрушением биоплёнки (физическим или с помощью галактана) и высвобождением этих бактерий.

10. Действие галактана на биоплёнки других видов

Галактан существенно изменял морфологию биоплёнок *Stenotrophomonas maltophilia*, но почти не влиял на количество биомассы, а также оказывал слабый стимулирующий эффект на биоплёнки *Burkholderia cenocepacia*.

11. Клонирование, наработка и выделение лизостафина, дисперсина В и химерного белка Lst-DspB

Гены, кодирующие лизостафин и дисперсин В, соответствующие плазмиды и штаммы-продуценты были получены аналогично таковым для LecA. Ген, кодирующий химерный белок Lst-DspB, был получен слиянием генов лизостафина и дисперсина В с коротким глицин-сериновым линкером между ними стандартными генно-инженерными методами. Лизостафин и Lst-DspB были очищены с помощью катионообменной хроматографии, дисперсин В – с помощью металл-хелатной хроматографии.

12. Пептидазная активность лизостафина и Lst-DspB

Lst-DspB сочетает в себе два фермента с разным типом каталитической активности: пептидазную активность лизостафина и гликозидгидролазную активность дисперсина В. Слияние лизостафина и дисперсином В в один химерный белок могло повлиять на оба типа активности. Способность лизостафина и Lst-DspB гидролизовать изолированный пентаглициновый пептид была изучена по разработанной ранее методике (Grishin *et al.*, 2020) и было показано, что уровень пептидазной активности Lst-DspB не отличался от лизостафина.

13. Гликозидгидролазная активность дисперсина В и Lst-DspB

Гликозидгидролазная активность Lst-DspB была определена по его способности расщеплять *p*-нитрофенил *N*-ацетил- β -D-глюкозаминид и не отличалась от гликозидгидролазной активности дисперсина В.

14. Бактериолитическая активность лизостафина и Lst-DspB

Пептидогликан бактериальной клеточной стенки представляет собой сложную полимерную структуру, в которой полисахаридные цепочки перешиты пептидными мостиками. Существенно больший размер Lst-DspB по сравнению с лизостафином может препятствовать его связыванию с пептидогликаном и проникновению в поры между полисахаридными цепочками и пептидными мостиками, из-за чего действие

лизостафина и Lst-DspB на бактериальные клетки может отличаться даже несмотря на одинаковую каталитическую активность.

Для сравнения бактериолитической активности лизостафина и Lst-DspB была измерена скорость просветления суспензии бактериальных клеток под действием разных концентраций этих белков, а также определены МИК. Скорость просветления бактериальной суспензии, равная 0.01 единиц оптической плотности в минуту, достигалась при концентрации лизостафина 12.5 нМ. Для достижения такой же бактериолитической активности требовалось 171.7 нМ Lst-DspB, что в 13.7 раз больше. МИК лизостафина в отношении использованного в данной работе штамма оказалась равна 0.1 мкг/мл, в то время как для Lst-DspB она составила 25.6 мкг/мл. Таким образом, антибактериальная активность Lst-DspB оказалась существенно ниже активности лизостафина, вероятнее всего, из-за большего размера слитного белка.

15. Действие лизостафина, дисперсина В, их смеси и Lst-DspB на биоплёнки *S.*

aureus

Действие лизостафина и дисперсина В было исследовано в отношении биоплёнок *S. aureus*, культивированных в разных условиях. Обработка 2.5 мкг/мл лизостафина в течение 2 ч приводила к практически полной элиминации биоплёнок, культивированных в стандартной питательной среде. При этом биоплёнки, культивированные в присутствии плазмы крови, не могли быть элиминированы даже 12.8 мкг/мл лизостафина. Дисперсин В, напротив, действовал только на биоплёнки, культивированные в присутствии плазмы крови, и не показывал никакой активности в отношении биоплёнок, выращенных без плазмы. Дальнейшие эксперименты проводили только на биоплёнках, культивированных в присутствии плазмы крови.

Исследование совместного действия лизостафина и дисперсина В показало, что в определённых концентрациях они обладают синергическим эффектом, то есть способны снижать количество биомассы в биоплёнке сильнее, чем это можно было бы ожидать при простом аддитивном действии (рис. 8).

Lst-DspB превосходил по своим антибиоплёночным свойствам оба исходных белка, поскольку практически полностью элиминировал биоплёнки *S. aureus* в меньших концентрациях, чем дисперсин В.

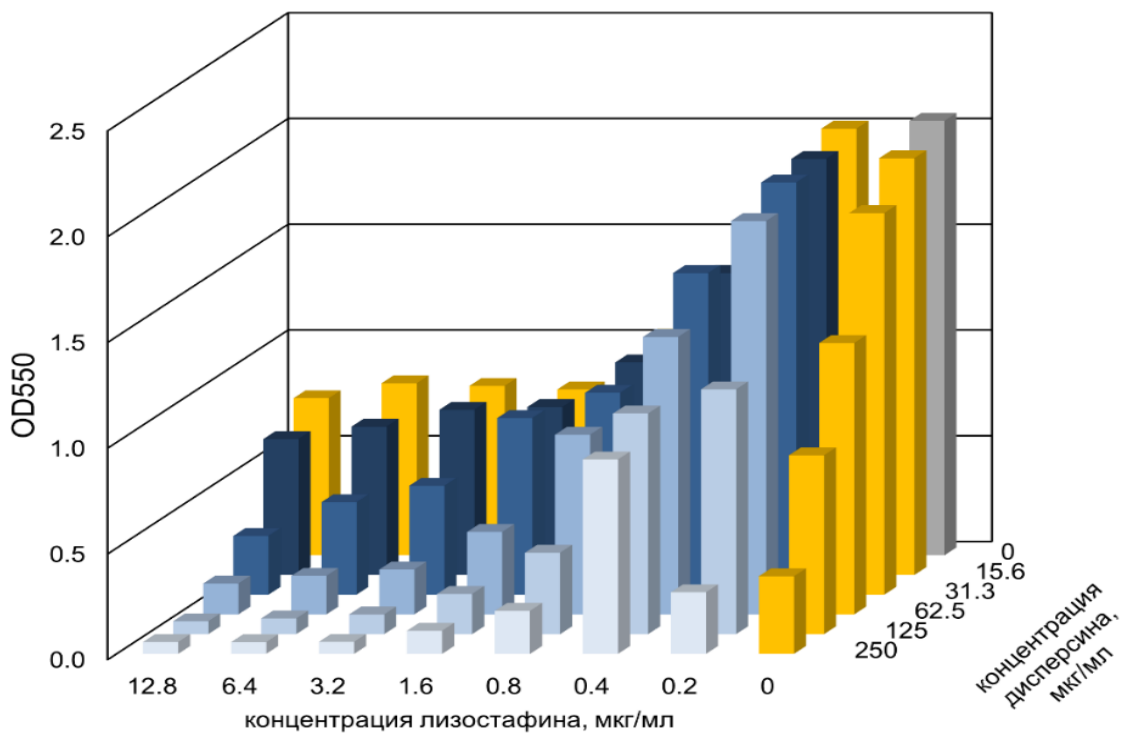


Рисунок 8. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213 комбинацией лизостафина и дисперсина В в разных концентрациях.

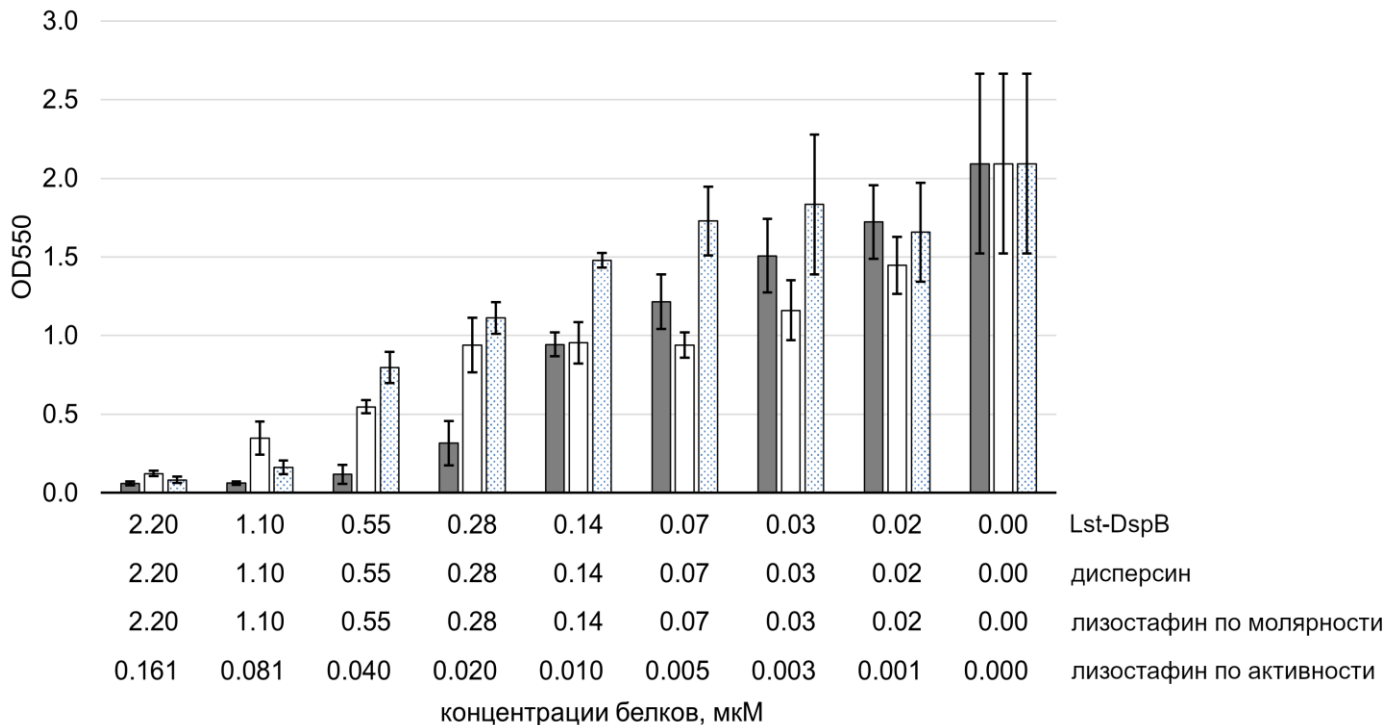


Рисунок 9. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213 Lst-DspB (закрашенные столбцы) в сравнении со смесью лизостафина и дисперсина В в эквимольных концентрациях (пустые столбцы) или в концентрациях, нормированных по уровню активности (заштрихованные столбцы).

При сравнении антибиоплёночной активности Lst-DspB со смесью лизостафина и дисперсина В, взятых в эквимольных концентрациях, оказалось, что Lst-DspB более эффективен в концентрациях 280 нМ и выше (рис. 9). При нормировании концентрации лизостафина на уровень бактериолитической активности Lst-DspB химерный белок Lst-DspB превосходил по эффективности смесь лизостафина и дисперсина В на всем диапазоне концентраций (рис. 9).

Таким образом, слияние лизостафина и дисперсина В в химерный белок Lst-DspB позволяет повысить антибиоплёночную активность как по сравнению с каждым из исходных белков по-отдельности, так и по сравнению со смесью этих белков.

16. Адсорбция и высвобождение лизостафина и дисперсина В из диопсида

Чтобы исследовать возможность введения лизостафина и дисперсина В в костно-пластические материалы для придания им антибиоплёночных свойств, лизостафин и дисперсин В были сорбированы на порошок диопсида – $MgCaSi_2O_6$ -керамики, перспективной с точки зрения применения в составе материалов для костной пластики. Порошок диопсида адсорбировал из раствора 5.2 мкг лизостафина и 5.9 мкг дисперсина В на 1 мг диопсида. Исследование динамики выхода адсорбированного на диопсиде лизостафина и дисперсина В показало, что примерно 30% от всего адсорбированного лизостафина выходит с диопсида в течение 72 часов, причём две трети этого количества выходит в течение первых 5 часов, а после 24-х часов выход лизостафина практически прекращался. Дисперсин В сорбировался на порошок диопсида необратимо и не демонстрировал сколько-нибудь заметного выхода в течение 72-х часов. В дальнейших экспериментах исследовали только диопсид с адсорбированным на нем лизостафином.

17. Антибактериальная и антибиоплёночная активность диопсида с лизостафином

Антибактериальная и антибиоплёночная активности диопсида с адсорбированным на нем лизостафином определялись количеством и кинетикой выхода лизостафина. МИК такого диопсида была равна 0.06 мг/мл, что соответствует примерно 0.31 мкг/мл адсорбированного лизостафина (МИК свободного лизостафина 0.1 мкг/мл). Инкубация биоплёнок *S. aureus* в течение 24-х часов в присутствии 0.1 мг/мл диопсида практически полностью разрушала биоплёнку (рис. 10А). Свободный лизостафин оказывал аналогичный эффект в концентрациях 0.035-0.07 мкг/мл и выше (рис. 10Б), в то время как контрольный диопсид не оказывал никакого эффекта. Таким образом, диопсид с адсорбированным на нем лизостафином демонстрирует выраженный антибиоплёночный эффект, что делает его перспективным материалом для дальнейшего изучения.

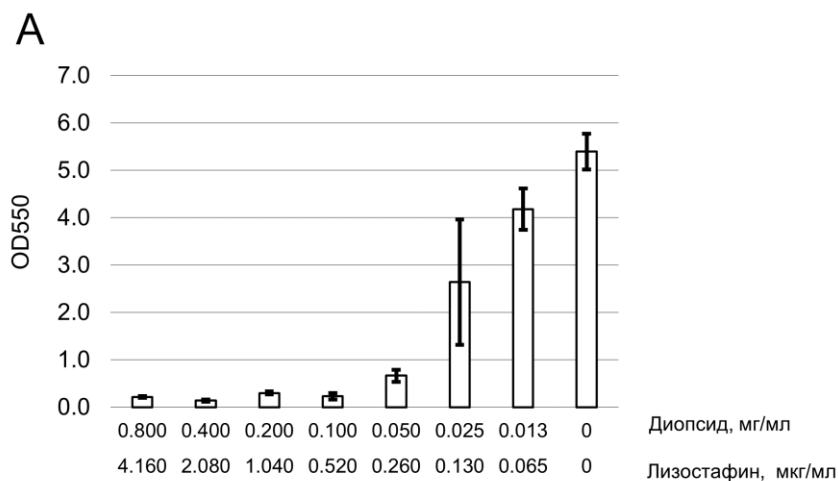
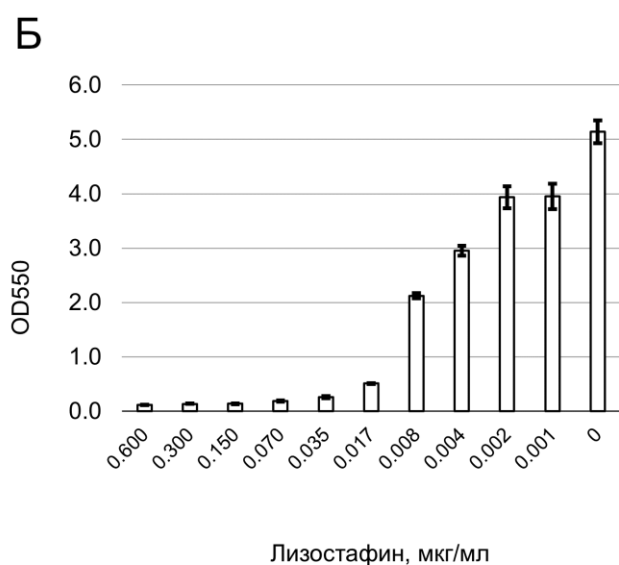


Рисунок 10. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213 разными концентрациями диопсида с адсорбированным на нем лизостафином (А) или свободным лизостафином в качестве контроля (Б).



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактериальные биоплёнки представляют собой важную проблему современного здравоохранения и поиск новых соединений, позволяющих бороться с их образованием, является крайне актуальной задачей. Среди перспективных подходов к ингибированию и разрушению биоплёнок можно выделить использование природных олиго- и полисахаридов, взаимодействующих с белками матрикса, а также антибактериальных лизинов и ферментов, гидролизующих компоненты матрикса.

В данной работе было обнаружено несколько соединений, способных взаимодействовать с лектином LecA матрикса биоплёнок *P. aeruginosa*. В частности, блокировать функции LecA оказался способен полисахарид галактоманнан и олигосахариды, получаемые его контролируемым гидролизом (галактозилманнотриоза и дигалактозил-маннопентаоза), а также полисахарид галактан. Оба полисахарида и, соответственно, олигосахариды содержат концевые остатки галактозы, за счет которых, скорее всего, и происходит взаимодействие с LecA, поскольку остатки галактозы являются его природным лигандом.

Среди олигосахаридов наиболее эффективным лигандом LecA оказалась дигалактозил-маннопентаоза. Этот олигосахарид обладал наиболее высокой аффинностью к LecA из всех олигосахаридов, описанных в литературе, однако не подавлял развитие биоплёнок.

Полисахариды являются природными мультивалентными соединениями и поэтому представляют собой особенный интерес в качестве блокаторов LecA. Среди исследованных полисахаридов наиболее эффективным ингибитором формирования биоплёнок *P. aeruginosa* оказался галактан. Хотя галактан не препятствовал первоначальной адгезии бактерий на поверхности пластика, он блокировал формирование полноценной биоплёнки, а также частично разрушал или изменял нормальную морфологию уже сформированных биоплёнок. Механизм действия галактана, по-видимому, заключается в избыточной или неправильной агрегации бактериальных клеток, из-за чего нарушается процесс нормальной агрегации и формирования биоплёнок.

Несмотря на это, галактан оказался не способен повысить эффективность антибиотиков в отношении биоплёнок *P. aeruginosa*. Напротив, неожиданным свойством галактана оказалась его способность частично защищать бактерии внутри биоплёнок от амикацина и ципрофлоксацина. Такое свойство не было описано для полисахаридов ранее. Кроме того, в низких концентрациях галактан, наоборот, стимулировал образование биоплёнки *P. aeruginosa*. Все это препятствует практическому применению галактана в качестве средства для борьбы с образованием биоплёнок, а также демонстрирует слабую предсказуемость эффектов, оказываемых полисахаридами на бактериальные биоплёнки. На настоящий момент невозможно предсказать эффективность и специфичность полисахарида в отношении бактериальных биоплёнок на основании его химической структуры. Более того, как показывают полученные в данной работе результаты, даже в случае полисахаридов, способных подавлять образование биоплёнок, их одновременное применение с традиционными антибиотиками может давать результаты, противоположные желаемым.

Другой подход, исследованный в данной работе и заключающийся в совместном применении антибактериального лизина лизостафина и гликозидгидролазы дисперсина В, расщепляющей полисахарид PNAG, напротив, показал высокую эффективность на примере биоплёнок *S. aureus*. Как антибактериальные лизины, так и ферменты, расщепляющие компоненты матрикса, являются белками, и, хотя стоимость получения таких соединений намного выше стоимости производства полисахаридов, они обладают рядом преимуществ. В частности, эти ферменты могут быть не только использованы совместно для существенного увеличения антибиоплёночной активности, но и, благодаря своей белковой природе, соединены методами генной инженерии в составе единого слитного белка. Как показано в данной работе, такой подход позволяет ещё больше повысить эффективность этих соединений

в отношении бактериальных биоплёнок. Кроме того, белки-ферменты могут быть иммобилизованы на различных носителях для целенаправленной доставки и контролируемого выхода, что также продемонстрировано в данной работе. Помимо этого, фармакокинетические свойства таких антибактериальных белков могут быть оптимизированы добавлением дополнительных доменов, а развитие устойчивости к антибактериальным лизинам менее вероятно по сравнению с традиционными антибиотиками. Учитывая все вышесказанное, с нашей точки зрения в ближайшей перспективе подходы, связанные с антибактериальными лизинами, представляют большой практический интерес по сравнению с олиго- и полисахаридами.

ВЫВОДЫ

1. продемонстрирована способность растительных полисахаридов вербаскозы, галактозил-маннотриозы и дигалактозил-маннопентаозы, а также полисахарида галактана взаимодействовать с лектином LecA *P. aeruginosa*. При этом одна молекула дигалактозил-маннопентаозы оказалась способна связывать две молекулы LecA одновременно, за счет чего её аффинность к LecA превышает аффинность всех олигосахаридов, описанных к настоящему моменту в литературе.
2. продемонстрирована способность полисахарида галактана подавлять формирование биоплёнок *P. aeruginosa* и частично разрушать или изменять морфологию зрелых биоплёнок. Показано, что галактан не оказывает влияния на жизнеспособность бактериальных клеток.
3. Впервые показана способность соединений, связывающихся с лектином LecA (дигалактозил-маннопентаозы и галактана), не только ингибировать, но и стимулировать образование биоплёнок *P. aeruginosa* при их применении в определённом диапазоне концентраций, что крайне важно в свете популярности LecA в качестве мишени для разработки антибиоплёночных соединений.
4. На примере галактана впервые продемонстрирована способность полисахарида, не являющегося нормальным компонентом матрикса биоплёнок, защищать бактерии внутри биоплёнки от некоторых антибиотиков (ципрофлоксацин, амикацин) при их совместном использовании.
5. Впервые получен слитный белок, состоящий из антибактериального лизина (лизостафина) и фермента, гидролизующего полисахариды матрикса биоплёнок (дисперсина В), и показана его более высокая эффективность по сравнению с простой смесью исходных ферментов.
6. продемонстрирована возможность адсорбции лизостафина на кальций-магниевую силикатную керамику диопсид – перспективный материал для костной пластики, что придает ему антибактериальные и антибиоплёночные свойства и определяет возможность практического использования

иммобилизованного лизостафина для разработки имплантатов с антибактериальными свойствами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Grishin A.**, Karyagina A.S., Tiganova I.G., Dobrynina O.Y., Bolshakova T.N., Boksha I.S., Alexeyeva N.V., Stepanova T.V, Lunin V.G., Chuchalin A.G., Ginzburg A.L. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by LecA-binding polysaccharides // Int. J. Antimicrob. Agents. 2013. V. 42. № 5. P. 471–472.
2. **Гришин А.В.**, Кривоzubов М.С., Карягина А.С., Гинцбург А.Л. Лектины *Pseudomonas aeruginosa* как мишени для новых антибактериальных соединений // Acta Naturae. 2015. Т. 7. № 2. С. 43–56.
3. **Гришин А.В.**, Карягина А.С. Полисахарид галактан подавляет образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa*, но защищает сформированные биоплёнки от действия антибиотиков // Биохимия. 2019. Т. 84. № 5. С. 668–681.
4. **Grishin A.V.**, Karyagina A.S., Vasina D.V., Vasina I.V., Gushchin V.A., Lunin V.G. Resistance to peptidoglycan-degrading enzymes // Critical Reviews in Microbiology. 2020. V. 46. № 6. P. 703-726.
5. Kudinova A., **Grishin A.**, Grunina T., Poponova M., Bulygina I., Gromova M., Choudhary R., Senatov F., Karyagina A. Antibacterial and anti-biofilm properties of diopside powder loaded with lysostaphin // Pathogens. 2023. V. 12. № 2. 177.

Тезисы конференций

1. **Grishin A.**, Orlova P., Boksha I.S., Tiganova I., Dobrinina O., Lavrova N., Lyashchuk A. Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by LecA-binding poly- and oligosaccharides from natural sources. The 2nd Conference on Natural Health (2nd CONAHE), Mostaganem University, Algeria, October 26-28, 2014, P. 16.
2. **Гришин А.** Взаимодействие галакто-манно-олигосахаридов с лектином LecA *Pseudomonas aeruginosa* и подавление образования биоплёнок. Тезисы докладов XXII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2015, секция Биология, Москва, Россия, Апрель 13-17, 2015, С. 214-215.
3. **Гришин А.В.**, Лунин В.Г., Карягина А.С. Полисахарид картофеля галактан в качестве ингибитора образования биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa*. Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, Россия, Февраль 20-22, 2017, С. 192-193.
4. Шестак Н.В., **Гришин А.В.**, Лящук А.М., Лаврова Н.В., Струкова Н.В., Генералова М.С., Рязанова А.В., Карягина А.С., Лунин В.Г. Активность и фармакокинетические свойства лизостафина с альбумин-связывающим доменом. Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, Россия, Февраль 25-27, 2019, С. 195-197.
5. Васина И.В., **Гришин А.В.**, Карягина А.С., Лунин В.Г. Увеличение антибактериальной активности лизостафина с альбумин-связывающим доменом за счет высвобождения нативного лизостафина. Научные труды III объединённого научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, том 2, Сочи, Россия, Октябрь 3-8, 2021, С. 92.