

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»

Министерства Здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Гришин Александр Владимирович

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

Специальность:

1.5.11. – Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Карягина-Жулина А.С.

д.б.н., профессор

Москва – 2024

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1 Биоплёнки	13
1.2 <i>P. aeruginosa</i>	16
1.3 Биоплёнки <i>P. aeruginosa</i>	17
1.4 <i>S. aureus</i>	20
1.5 Биоплёнки <i>S. aureus</i>	21
1.6 Устойчивость биоплёнок к антибиотикам	22
1.7 Стратегии борьбы с биоплёнками	24
1.8 Лектин LecA <i>P. aeruginosa</i>	35
1.9 Функции LecA	38
1.10 Блокаторы LecA	40
1.11 Полисахариды и олигосахариды – ингибиторы образования биоплёнок	48
1.12 Антибактериальные лизины	58
1.13 Ферменты, разрушающие матрикс биоплёнок	64
Глава 2. Материалы и методы	67
2.1 Штаммы и реактивы	67
2.2 Клонирование, наработка и выделение рекомбинантного LecA	68
2.3 Гемагглютинация	70
2.4 Изотермальная титрационная калориметрия (ИТС)	71
2.5 Культивирование, ингибирование и разрушение биоплёнок <i>P. aeruginosa</i> в 96-луночных планшетах	72
2.6 Культивирование, ингибирование и разрушение биоплёнок <i>P. aeruginosa</i> на полипропиленовых купонах	74
2.7 Определение влияния полисахаридов на планктонный рост <i>P. aeruginosa</i>	75
2.8 Определение МИК и МБК	76
2.9 Определение МКЭБ	77
2.10 Определение количества жизнеспособных бактерий в биоплёнках <i>P. aeruginosa</i>	79
2.11 Флуоресцентная микроскопия	80

2.12 Клонирование, наработка и очистка лизостафина, дисперсина, Lst-DspB	81
2.13 Определение пептидазной активности лизостафина и Lst-DspB.....	83
2.14 Определение гликозидгидролазной активности дисперсина и Lst-DspB	84
2.15 Определение бактериолитической активности лизостафина и Lst-DspB	84
2.16 Определение МИК лизостафина, Lst-DspB и диопсида.....	85
2.17 Культивация и разрушение биоплёнок <i>S. aureus</i>	85
2.18 Адсорбция белков на диопсид	87
2.19 Кинетика выхода белков с диопсида	87
2.20 Иммуноферментный анализ.....	88
2.21 Оценка антибактериальной активности лизостафина по зонам лизиса	88
2.22 Статистический анализ.....	89
Глава 3. Результаты	90
3.1 Клонирование, наработка и выделение LecA	90
3.2 Тестирование олигосахаридов на способность связываться с LecA	92
3.3 Тестирование олигосахаридов на способность подавлять образование биоплёнок <i>P. aeruginosa</i>	99
3.4 Тестирование полисахаридов на способность связываться с LecA.....	100
3.5 Тестирование полисахаридов на способность подавлять образование биоплёнок <i>P. aeruginosa</i>	101
3.6 Детальное исследование влияния галактана на биоплёнки <i>P. aeruginosa</i>	102
3.7 Влияние галактана на планктонный рост <i>P. aeruginosa</i>	112
3.8 Тестирование совместного действия антибиотиков и галактана на биоплёнки <i>P. aeruginosa</i>	116
3.9 Возобновление роста биоплёнки, обработанной амикацином, с помощью фосфатов, физического разрушения или галактана	123
3.10 Действие галактана на биоплёнки других видов	124
3.11 Клонирование, наработка и выделение лизостафина, дисперсина и химерного белка Lst-DspB.....	126
3.12 Пептидазная активность лизостафина и Lst-DspB	126
3.13 Гликозидгидролазная активность дисперсина и Lst-DspB	127
3.14 Бактериолитическая активность лизостафина и Lst-DspB	128
3.15 Действие лизостафина, дисперсина, их смеси и Lst-DspB на биоплёнки <i>S. aureus</i>	130

3.16 Адсорбция и высвобождение лизостафина и дисперсина из диопсида	136
3.17 Антибактериальная и антибиоплёночная активность диопсида с лизостафином	139
Глава 4. Обсуждение результатов.....	141
Заключение.....	155
Выводы	158
Список сокращений и условных обозначений	159
Список литературы.....	160

Введение

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 предсуществующей 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 – скоплений клеток микроорганизмов, окружённых высокомолекулярным матриксом (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Существовая в форме биоплёнок, бактерии становятся намного более устойчивыми к неблагоприятным воздействиям среды, антибиотикам и факторам иммунной системы. С одной стороны, это способствует сохранению патогенных микроорганизмов в окружающей среде, а с другой стороны – помогает микроорганизмам колонизировать органы и ткани человека, а также поверхности имплантируемых материалов, что в итоге может привести к развитию хронической инфекции или катетер-ассоциированной и имплантат-ассоциированной бактериемии.

В настоящий момент значительные усилия научного сообщества сосредоточены на изучении бактериальных биоплёнок и поиске новых средств борьбы с ними. Эти средства должны принципиально отличаться по механизмам действия от традиционных антибиотиков, поскольку последние малоэффективны в борьбе с бактериальными биоплёнками. При этом они, как и любые другие лекарственные средства, должны соответствовать стандартам безопасности. Кроме того, желательно, чтобы они были дешевы и удобны в использовании.

Одним из определяющих свойств биоплёнок является наличие матрикса – полимерного связующего компонента, скрепляющего бактерии внутри биоплёнки друг с другом и затрудняющего проникновение антибиотиков и клеток иммунной системы (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Нарушение взаимодействия компонентов матрикса друг с другом и/или с бактериальными клетками представляет собой перспективный подход к борьбе с биоплёнками (Кoo *et al.*, 2017). Матрикс биоплёнок большинства микроорганизмов состоит из полисахаридов, внеклеточной ДНК и специализированных белков. При этом полисахариды являются одним из ключевых компонентов, а их взаимодействие друг с другом и клетками бактерий обеспечивается лектинами – специальными белками, связывающими сахара. Для того, чтобы нарушить нормальные взаимодействия полисахаридных компонентов матрикса, можно использовать молекулы, блокирующие связывание полисахаридов с лектинами. Очевидными кандидатами на роль таких молекул являются различные природные олиго- и полисахариды.

Помимо наличия полимерного матрикса важным свойством бактериальных биоплёнок является фенотипическая гетерогенность бактериальных клеток (Stewart, Franklin, 2008). Как правило, только часть клеток в биоплёнке находится в метаболически активном состоянии и может быть элиминирована стандартными антибиотиками. Другая же часть клеток существует в форме персистеров – метаболически неактивных клеток, толерантных к действию антибиотиков (Lewis, 2007; Urbaniec *et al.*, 2021). Для того, чтобы добиться эрадикации биоплёнок, антибактериальные соединения должны быть одинаково эффективны как в отношении метаболически активных клеток, так и в отношении клеток-персистеров. Такими соединениями являются антибактериальные лизины – белки-ферменты, расщепляющие пептидогликан 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 уничтожения, обычно выше концентраций, эффективных против планктонных клеток. Поскольку наиболее вероятной причиной этого эффекта является высокая плотность клеток в биоплёнке и наличие внеклеточного матрикса, перспективным подходом является совместное использование антибактериальных лизинов и

специфических белков гликозидгидролаз, целенаправленно разрушающих полисахариды, входящие в состав матрикса биоплёнок.

Среди основных и наиболее проблемных возбудителей оппортунистических инфекций можно выделить грамотрицательный вид *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойную палочку) и грамположительный вид *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) (Botzenhart, Döring, 1993; Lowy, 1998). Оба этих вида не только являются важными патогенами, но и часто используются в качестве модельных объектов в исследованиях бактериальных биоплёнок. В данной работе исследовались два разных подхода к борьбе с биоплёнками: блокирование белков-лектинов природными олиго- и полисахаридами и разрушение бактериальных клеток и полисахаридов матрикса рекомбинантными белками-ферментами. В первом случае в качестве модели были выбраны биоплёнки *P. aeruginosa* и лектин LecA в качестве лектина-мишени для действия олиго- и полисахаридов. Во втором случае в качестве модели были выбраны биоплёнки *S. aureus*, а также антибактериальный лизин лизостафин и гликозидгидролаза дисперсин В, гидролизующая полисахарид матрикса биоплёнок стафилококка PNAG, – в качестве антибиоплёночных агентов.

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

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить 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 лизоцима и дисперина В на биоплёнки *S. aureus* в сравнении с действием каждого из белков по-отдельности.
5. Исследовать эффективность слитного белка, состоящего из лизоцима и дисперина В, в отношении биоплёнок *S. aureus* в сравнении с простой смесью исходных белков.
6. Исследовать возможность введения лизоцима и дисперина В в костно-пластические материалы для придания им антибиоплёночных свойств.

Научная новизна и значимость работы

Впервые показано, что растительные олигосахариды вербаскоза, галактозилманнотриоза 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 (дисперсина 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 работы

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 дисперсина 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 диопсида, что может быть использовано при разработке костно-пластических материалов с антибактериальными и антибиоплёночными свойствами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Растительные полисахариды способны взаимодействовать с лектином LecA *P. aeruginosa*. В ходе взаимодействия одна молекула дигалактозилманнопентаозы 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), международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (20-22 февраля 2017 г., и 25-27 февраля 2019 г., Москва) и объединённом научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (3-8 октября 2021 г., Сочи).

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.

Структура и объём 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 России 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. Лящук 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 диопсида 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 биоплёнки *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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Биоплёнки

Одной из важнейших проблем, связанных с оппортунистическими инфекциями, является способность их возбудителей формировать биоплёнки. Микроорганизмы в составе биоплёнок обладают повышенной устойчивостью к антибиотикам и другим антимикробным средствам, факторам иммунной системы человека, а также с трудом поддаются механическому удалению.

Биоплёнка – это структурно и функционально сложная биологическая система, представляющая собой популяцию бактерий или грибов, окружённых внеклеточным матриксом (рис. 1). Как правило, биоплёнки формируются на какой-либо поверхности, биотической или абиотической. Практически все бактерии способны образовывать биоплёнки, и эта способность является одним из ключевых факторов в их приспособлении к чрезвычайно разнообразным и часто неблагоприятным условиям среды (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Основными компонентами матрикса биоплёнок являются полисахариды, белки и внеклеточная ДНК, в меньшем количестве присутствуют липиды, поверхностно-активные соединения, а также мембранные везикулы в случае грамотрицательных бактерий. Какие именно белки, полисахариды и ДНК входят в состав биоплёнки, а также их количественное соотношение, определяется как видовым и штаммовым составом биоплёнки, так и внешними условиями. Матриксные полисахариды, продуцируемые различными бактериями, могут состоять из одинаковых или разных остатков сахаров (гомо- или гетерополисахариды), могут быть линейными или разветвлёнными, нейтральными, положительно или отрицательно заряженными. При этом зачастую один вид бактерий может продуцировать несколько типов матриксных полисахаридов. Среди белков, входящих в состав матрикса биоплёнок, можно выделить структурные белки, скрепляющие между собой цепочки полисахаридов и обеспечивающие взаимодействие бактерий внутри биоплёнки с её матриксом; к таким белкам относятся лектины, амилоидные белки, белки пилей и флагелл. Другими распространёнными компонентами биоплёнок являются ферменты, необходимые для

модификации полисахаридов матрикса или расщепления различных высокомолекулярных соединений на низкомолекулярные компоненты, которые затем могут быть использованы бактериями в качестве источника энергии и вещества. Наконец, одним из основных компонентов матрикса практически любой биоплёнки является внеклеточная ДНК, хотя её роль и происхождение отличаются в биоплёнках разных видов бактерий (Flemming, Wingender, 2010).

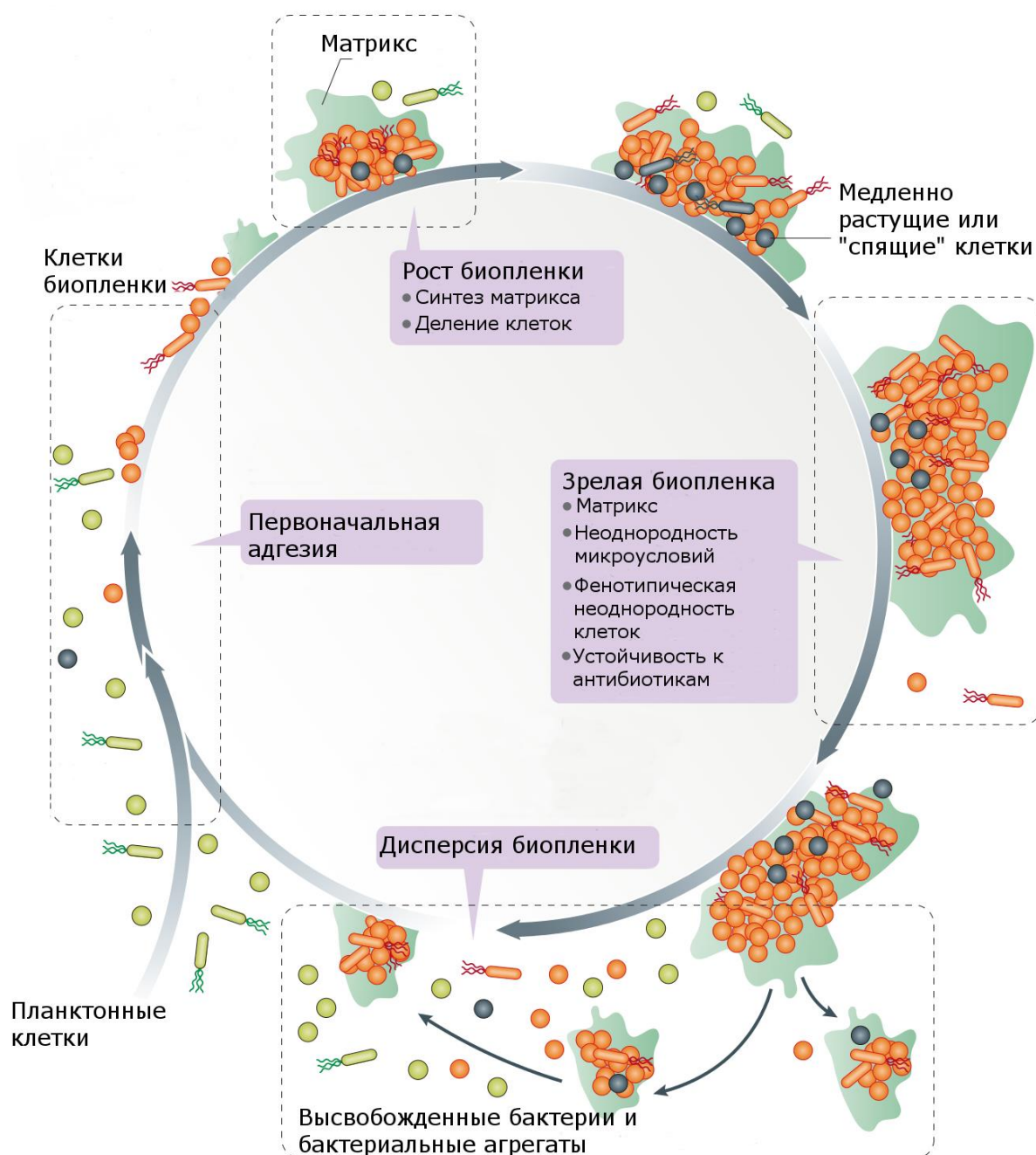


Рисунок 1. Схематическое изображение жизненного цикла биоплёнки. Рисунок адаптирован из (Koo *et al.*, 2017).

Процесс образования биоплёнки начинается с адгезии, или прикрепления планктонных бактерий к поверхности. Прикрепившиеся бактерии размножаются и формируют микроколонии, которые начинают продуцировать матрикс и формировать полноценную биоплёнку. Сформировавшаяся биоплёнка остается динамической системой и не только обеспечивает защиту бактерий, но также имеет механизмы для их распространения. Благодаря частичному гидролизу матрикса специализированными ферментами высвобождаются отдельные подвижные бактерии, способные к активному распространению. Также могут высвобождаться бактериальный агрегаты, состоящие из матрикса и группы бактерий внутри него, распространяющиеся как единое целое с током жидкости (рис. 1). Важно отметить, что процессы образования и дисперсии биоплёнок являются регулируемыми процессами, ключевую роль в формировании и жизни биоплёнок играют механизмы взаимодействия и кооперации бактерий, известные как кворум-сенсинг – “чувство кворума” (quorum sensing) (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Из-за достаточно сложной пространственной структуры биоплёнки микроусловия внутри неё могут быть крайне неоднородны и отличаться по доступности питательных веществ, кислорода, концентрации продуктов жизнедеятельности бактерий и т.д. В связи с этим фенотипически неоднородна и популяция бактерий внутри биоплёнки (Stewart, Franklin, 2008). Бактерии, находящиеся ближе к поверхности биоплёнки, как правило активно делятся и производят матрикс, в то время как бактерии, находящиеся в глубине биоплёнки, в условиях недостатка питательных веществ могут существовать в неактивном состоянии. Часть таких неактивных, «спящих» или дормантных бактерий относится к персистерам – специализированным формам бактерий, приспособленным для выживания в неблагоприятных условиях или в присутствии антибиотиков (Lewis, 2007; Urbaniec *et al.*, 2021). Кроме того, фенотипическая неоднородность бактерий внутри биоплёнки может быть следствием накопления мутаций в субпопуляции клеток (Stewart, Franklin, 2008).

Как правило, биоплёнки как сообщества гораздо более устойчивы к воздействию антибиотиков по сравнению с планктонными бактериями. В качестве объяснения такой повышенной устойчивости биоплёнок к антибиотикам и

дезинфицирующим агентам было предложено несколько механизмов. Во-первых, компоненты матрикса могут служить в качестве барьера для таких неспецифических дезинфицирующих агентов, как ультрафиолетовое излучение, перекись водорода и т.д., а также предохранять биоплёнку от высыхания. Кроме того, было показано, что матрикс некоторых биоплёнок способен связывать определённые антибиотики и препятствовать их проникновению внутрь биоплёнки. Этот же механизм, вероятно, защищает биоплёнки от различных факторов иммунной системы человека (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Mah, 2012). Во-вторых, зачастую бактерии внутри биоплёнки начинают активнее экспрессировать гены специфической устойчивости к антибиотикам по сравнению с планктонными бактериями (Mah, 2012). Наконец, гетерогенность популяции бактерий внутри биоплёнки, в особенности наличие в её составе персистирующих форм, также приводит к повышенной устойчивости к антибиотикам. Даже после уничтожения всех активно делящихся бактерий внутри биоплёнки, бактерии-персистеры, устойчивые к воздействию большинства антибиотиков, выходят из своего «спящего» состояния и вновь заселяют биоплёнку (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Lewis, 2007; Mah, 2012).

Образование биоплёнок во время инфекции приводит к серьезным проблемам, связанным с невозможностью полностью элиминировать патоген, и часто способствует переходу инфекции в хроническую форму (Costerton, 1999). При этом по некоторым оценкам, не менее 65% всех бактериальных заболеваний сопровождается образованием биоплёнок (Lewis, 2007). Таким образом, разработка подходов к ингибированию образования новых или разрушению уже сформировавшихся биоплёнок является чрезвычайно актуальной задачей.

1.2 *P. aeruginosa*

P. aeruginosa - грамотрицательная аэробная палочковидная бактерия, также называемая синегнойной палочкой. В окружающей среде *P. aeruginosa* предпочитает влажные местообитания, бактерии этого вида обнаруживаются в раковинах, туалетах и других местах, связанных с водой, они часто выделяются из сточных вод. Другим обычным для *P. aeruginosa* местообитанием является почва, в особенности ризосфера растений. *P. aeruginosa* является широко распространённым возбудителем

оппортунистических инфекций, в основном – внутрибольничных инфекций. Не менее 10% всех внутрибольничных инфекций вызывается *P. aeruginosa* (Botzenhart, Döring, 1993). В больницах *P. aeruginosa* поселяется в первую очередь во влажных условиях, таких как раковины и туалеты, но также может обитать на полу, кроватях, может быть выделен с рук персонала. Кроме того, источником инфекции может стать сам пациент, если он был бессимптомно колонизирован *P. aeruginosa* до госпитализации (Blanc *et al.*, 1998; Botzenhart, Döring, 1993; Lyczak *et al.*, 2000). Этот патоген способен поражать практически любые ткани и органы человека, становясь таким образом причиной множества различных заболеваний. Наиболее часто *P. aeruginosa* вызывает острую пневмонию, хроническую инфекцию нижних дыхательных путей, бактериемию, острые и хронические инфекции мочевыводящих путей, наружный отит, дерматит, раневой и ожоговый сепсис, пиодермию и гангренозную эктиму у пациентов с нейтропенией и, реже, такие заболевания, как кератит, менингит, абсцесс головного мозга, эндокардит, различные инфекции костей и суставов и инфекции желудочно-кишечного тракта, такие как некротический энтероколит (Mesaros *et al.*, 2007). Кроме того, *P. aeruginosa* часто колонизирует легкие больных муковисцидозом - наследственным заболеванием, связанным с дефектом хлоридных каналов и приводящим к накоплению вязкого секрета в легких (George *et al.*, 2009).

1.3 Биоплёнки *P. aeruginosa*

P. aeruginosa активно образует биоплёнки на абиотических поверхностях, в том числе в лечебных учреждениях, а при инфекции - на органах и тканях человека.

При культивировании в лаборатории биоплёнки *P. aeruginosa* имеют, как правило, определённую архитектуру с характерными «ножками» (stalks) и «грибными шляпками» (mushroom caps) (рис. 2А). В то же время в некоторых условиях, например, при недостатке железа, *P. aeruginosa* формирует плоские биоплёнки без четкой структуры. Разные части биоплёнки заселены субпопуляциями бактерий, отличающихся общим уровнем метаболизма и набором экспрессируемых генов. В частности, бактерии в «шляпках» на границе со средой более метаболически активны по сравнению с бактериями в «ножках» (рис. 2Б) (Pamp *et al.*, 2008).

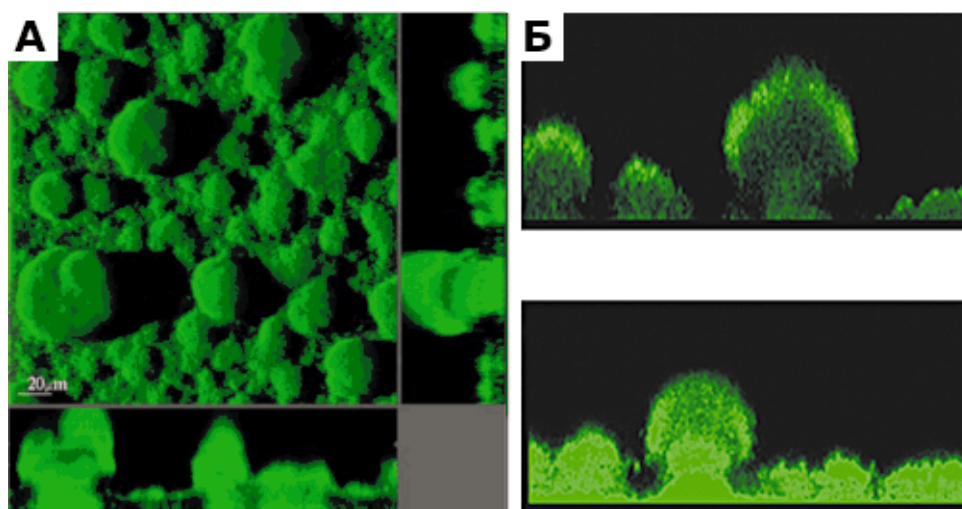


Рисунок 2. Архитектура биоплёнок *P. aeruginosa*, как правило наблюдаемая в экспериментах *in vitro*. (А) Изображение биоплёнки *P. aeruginosa* PAO1, экспрессирующего зелёный флуоресцентный белок, полученное с помощью конфокальной микроскопии; в центре – вид сверху, справа и снизу – вертикальные срезы; рисунок цитирован по (Tolker-Nielsen, 2015). (Б) Уровень метаболической активности (в данном случае – интенсивность синтеза белков) в различных частях биоплёнки *P. aeruginosa* PAO1; сверху – штамм, экспрессирующий нестабильный вариант зелёного флуоресцентного белка, снизу – штамм, экспрессирующий обычный зелёный флуоресцентный белок; рисунок цитирован по (Pamp *et al.*, 2008).

Матрикс биоплёнок *P. aeruginosa* состоит в первую очередь из трёх типов полисахаридов (Psl, Pel и альгинат) и внеклеточной ДНК; также в его состав входят белки, внеклеточные мембранные везикулы и рамнолипиды. Полисахарид Psl является основным полисахаридом биоплёнок немуккоидных штаммов *P. aeruginosa*. Он состоит из остатков маннозы, глюкозы и рамнозы (Byrd *et al.*, 2009). Высокомолекулярные формы этого полисахарида ассоциированы с поверхностью клеток *P. aeruginosa*, где они формируют спиральные структуры; низкомолекулярные растворимые формы Psl выделяются из супернатанта бактериальной культуры, очищенного от клеток. По-видимому, Psl играет ключевую роль во взаимодействии бактериальных клеток друг с другом и с поверхностью, на которой образуется биоплёнка. Клетки, синтезирующие большее количество Psl, быстрее прикрепляются к поверхности и имеют больший шанс остаться с ней связанными (Yang *et al.*, 2018). Если разрушить ассоциацию Psl с клетками *P. aeruginosa* с помощью фермента целлюлазы, бактерии теряют способность образовывать биоплёнки (Ma *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2012; Mann, Wozniak, 2012). В скреплении отдельных молекул полисахарида

Psl друг с другом, а также их прикреплении к клеткам *P. aeruginosa* участвуют лектины CdrA и LecB (Borlee *et al.*, 2010; Passos da Silva *et al.*, 2019). Pel – положительно заряженный полисахарид, в основном состоящий из чередующихся остатков галактозамина и N-ацетилгалактозамина (Mauff Le *et al.*, 2022). Было показано, что в биоплёнке Pel колокализуется с внеклеточной ДНК, вероятно, образуя с ней комплексы за счет ионных взаимодействий (Jennings *et al.*, 2015), и, как и Psl, взаимодействует с белком CdrA (Reichhardt *et al.*, 2020). В биоплёнках большинства штаммов Pel играет вспомогательную роль, и неспособность производить этот полисахарид, в отличие от Psl, не сказывается существенным образом на формировании биоплёнок (Colvin *et al.*, 2011; Colvin *et al.*, 2012). Штаммы, продуцирующие повышенные количества Psl и Pel, формируют мелкие, морщинистые колонии, и в англоязычной литературе называются «rugose small colony variants». Такие штаммы часто выделяют от больных муковисцидозом (Hausler, 2003). Третьим полисахаридом, синтезируемым *P. aeruginosa*, является альгинат. Альгинат состоит из частично ацетилированных остатков глюкуроновой и маннуриновой кислот и начинает активно продуцироваться только в анаэробных условиях (Bragonzi *et al.*, 2005). При достаточно длительной колонизации легких больных муковисцидозом происходит конверсия *P. aeruginosa* в так называемую мукоидную форму. Мукоидные штаммы *P. aeruginosa* несут мутации, способствующие конститутивной повышенной продукции альгината, чаще всего это мутации в гене *ticA*, кодирующем белок, в норме подавляющий синтез альгината. Среди предполагаемых функций альгината – защита от высыхания за счет способности альгината удерживать большое количество воды, защита от антибиотиков, фагоцитоза и свободных радикалов, продуцируемых нейтрофилами (Mann, Wozniak, 2012). Помимо полисахаридов, важным структурным элементом биоплёнок является внеклеточная ДНК, причём по мере «созревания» биоплёнки все большее количество внеклеточной ДНК принимает Z-форму, отличную от канонической B-формы, характерной для внутриклеточной ДНК, и устойчивую к действию большинства нуклеаз (Buzzo *et al.*, 2021). В случае *P. aeruginosa* она представляет собой ДНК лизированных бактериальных клеток (Allesen-Holm *et al.*, 2006). В матриксе биоплёнок функция ДНК, как и полисахаридов – формирование структуры биоплёнки; было показано, что добавление ДНКазы

способствует разрушению биоплёнок (Whitchurch *et al.*, 2002). Большая часть внеклеточной ДНК обнаруживается в «ножках» структурных элементов биоплёнки *P. aeruginosa* (Allesen-Holm *et al.*, 2006). По-видимому, бактериальные клетки прикрепляются к ДНК с помощью пилей IV типа (type IV pili), и, вероятно, способны перемещаться по ней (Harmsen *et al.*, 2010).

1.4 *S. aureus*

Staphylococcus aureus (золотистый стафилококк) – грамположительная неподвижная факультативно-анаэробная бактерия. *S. aureus* является одним из наиболее частых возбудителей гнойно-септических инфекций, а также инфекций, связанных с имплантируемыми материалами и катетерами. Человек является естественным носителем *S. aureus*. Как правило, *S. aureus* колонизирует кожу и слизистые оболочки верхних дыхательных путей человека, не вызывая каких-либо симптомов (Lowy, 1998). Однако при повреждении внешних покровов, например, при травмах, ранах, ожогах, установке катетеров или операционном вмешательстве, *S. aureus* может проникать внутрь организма и вызывать инфекцию. *S. aureus* способен вызывать такие разнообразные заболевания, как раневые и ожоговые гнойно-септические инфекции, остеомиелит, пневмония, эндокардит, менингит и сепсис (Lowy, 1998; Urish, Cassat, 2020). *S. aureus* обладает широким арсеналом факторов вирулентности, включающим белки-адгезины, обеспечивающие прикрепление к тканям человека; белок А, связывающий антитела и таким образом нейтрализующий их опсонизирующую активность; секретируемые токсины и суперантигены, а также белки, манипулирующие защитными механизмами человеческого организма, такие как коагулаза и стафилокиназа (Liesenborghs *et al.*, 2018). При этом одним из самых значимых фактором вирулентности, позволяющим *S. aureus* быть успешным патогеном, является его способность образовывать биоплёнки на имплантируемых материалах, таких как катетеры и протезы, а также на/в тканях человека.

Проблема стафилококковых инфекций усугубляется все более широким распространением метициллин-устойчивых штаммов. В настоящее время 50 и более процентов штаммов золотистого стафилококка устойчива к метициллину (Guo *et al.*, 2020). Это приводит к необходимости использования более токсичных антибиотиков

второй линии, таких как гликопептиды ванкомицин и даптомицин. При этом уже были обнаружены штаммы, устойчивые и к этим антибиотикам, хотя на настоящее время их распространение ограничено (Guo *et al.*, 2020). Все это приводит к необходимости разработки новых антимикробных соединений, активных в отношении золотистого стафилококка, и в том числе – эффективных в отношении формируемых им биоплёнок.

1.5 Биоплёнки *S. aureus*

Канонически основным компонентом матрикса биоплёнок *S. aureus* считается полисахарид поли- β 1-6-N-ацетилглюкозамин (PNAG, также называемый polysaccharide intercellular adhesin или PIA). За синтез и экспорт PNAG отвечают несколько белков, кодируемых опероном *icaADBC* (Arciola *et al.*, 2015). Изначально PNAG был описан как компонент матрикса биоплёнок *Staphylococcus epidermidis*, после чего была продемонстрирована его структурная роль в биоплёнках *S. aureus*, а также многих других бактерий (Arciola *et al.*, 2015). С другой стороны, в последнее время появилось большое количество работ, показывающих важность белков в качестве компонента матрикса биоплёнок *S. aureus*, в том числе внутриклеточных белков, попадающих во внеклеточное пространство биоплёнки либо за счет лизиса части клеток, либо за счет пока неизвестной системы экспорта (Foulston *et al.*, 2014; Otto, 2018). В некоторых работах демонстрируется, что состав матрикса зависит от конкретного штамма стафилококка (McCarthy *et al.*, 2015; Sugimoto *et al.*, 2018). При этом интересно, что *ica*-оперон обнаруживается в геноме большинства клинических изолятов *S. aureus* вне зависимости от состава матрикса их биоплёнок (Arciola *et al.*, 2015; Cramton *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2007). Помимо PNAG и матриксных белков, третьим важным компонентом бактериальных биоплёнок является внеклеточная ДНК. Биоплёнки, в матриксе которых ДНК играет важную роль, как правило, чувствительны к обработке ДНКазой, и в большинстве работ демонстрируется подавление образования биоплёнок *S. aureus* при добавлении ДНКазы либо, реже, разрушение ДНКазой сформированных биоплёнок (например, (Foulston *et al.*, 2014; Houston *et al.*, 2011; Izano *et al.*, 2008; Sugimoto *et al.*, 2018)). Наконец, известно, что *S. aureus* может использовать в матриксе биоплёнок белки организма-хозяина, в

частности фибрин, получаемый из фибриногена за счет его расщепления тромбином после его активации стафилококковой коагулазой. С-концевой домен коагулазы *S. aureus* связывается с фибриногеном, N-концевой домен – с каталитически неактивным протромбином. При связывании с протромбином коагулаза активирует его, благодаря чему тот получает способность процессировать фибриноген в фибрин и вызывать коагуляцию крови (Liesenborghs *et al.*, 2018). Такой эффект наблюдается при культивации биоплёнок в присутствии плазмы крови (Chen *et al.*, 2012; Crosby *et al.*, 2016; Kwiecinski *et al.*, 2016; Zapotoczna *et al.*, 2015). Биоплёнки, культивируемые в присутствии плазмы, существенно отличаются по морфологии от биоплёнок, культивируемых в её отсутствии (Sato *et al.*, 2019). Однако при этом остается неясным, как меняется роль PNAG, ДНК и белков *S. aureus* при встраивании фибрина в матрикс биоплёнок. Микрофотография биоплёнок *S. aureus*, культивированных в присутствии плазмы крови крыс, представлена на рис. 3.

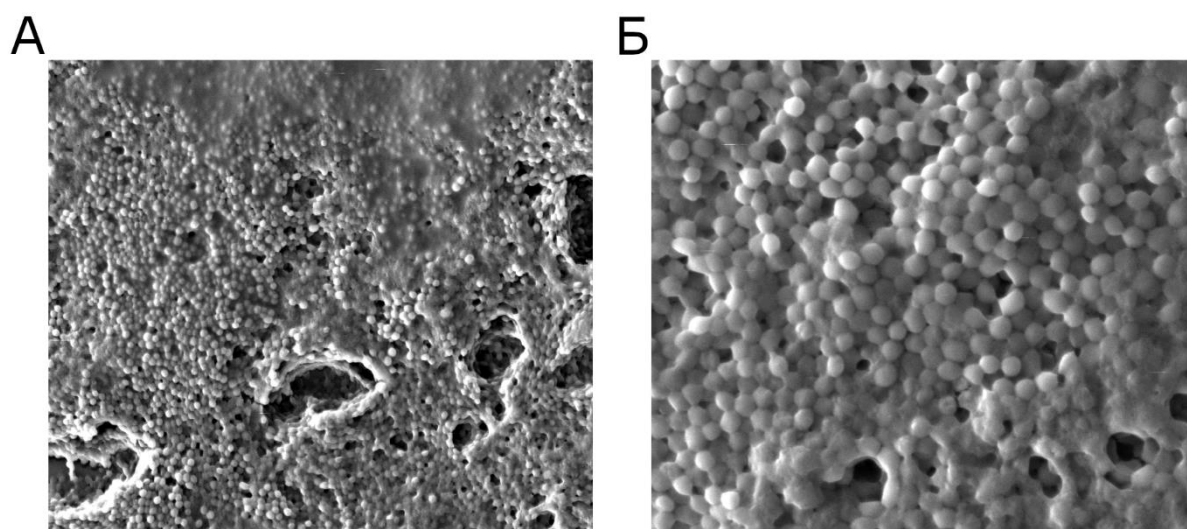


Рисунок 3. Биоплёнки *S. aureus* ATCC 29213, культивированные в присутствии плазмы крови крыс. Изображение получено с помощью сканирующего электронного микроскопа с увеличением 4000× (А) и 12000× (Б).

1.6 Устойчивость биоплёнок к антибиотикам

Повышенная устойчивость бактерий в составе биоплёнок к антибиотикам и другим антимикробным агентам широко цитируется в литературе (Ciofu, Tolker-Nielsen, 2019; Costerton, 1999; Donlan, Costerton, 2002; Harmsen *et al.*, 2010; Mah, 2012). Действительно, работы, в которых напрямую сравнивается устойчивость

клинических изолятов бактерий в планктонной форме и в составе биоплёнок, показывают, что биоплёнки многих (хотя и не всех) изолятов невозможно элиминировать дозами антибиотиков, достаточными для подавления или элиминации бактерий в планктонной форме. В работе Aaron и соавт., 2002 (Aaron *et al.*, 2002) сравниваются минимальная ингибирующая концентрация (МИК) и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) панели антибиотиков для 12 клинических изолятов *P. aeruginosa* (среди них 6 мукоидных и 6 немучоидных), растущих в планктонной форме и в форме биоплёнки. В зависимости от антибиотика, 50-80% изолятов имели МБК в 4 и более раз выше при культивировании в виде биоплёнки по сравнению с МБК, определённой для планктонной формы. Авторы также исследовали бактерицидную активность комбинаций двух и трёх антибиотиков, и оказалось, что, в среднем по 12 штаммам, 41 комбинация антибиотиков оказывается бактерицидной для бактерий, растущих в планктонной форме, но только 27 таких комбинаций – для бактерий, существующих в форме биоплёнки. В работе Hill *et al.*, 2005 (Hill *et al.*, 2005) исследовали действие 10 разных антибиотиков в концентрациях, достигаемых в крови после введения, на 16 изолятов *P. aeruginosa*, полученных от пациентов, больных муковисцидозом. Для всех антибиотиков и всех исследованных комбинаций антибиотиков количество чувствительных изолятов при культивировании в форме биоплёнки оказалось меньше, чем при культивировании в планктонной форме. При этом необходимо отметить, что разница в количестве устойчивых изолятов сильно варьировала в зависимости от антибиотика. Действие стандартных дезинфектантов на биоплёнки *P. aeruginosa* было исследовано в работе Smith *et al.* 2008 (Smith, Hunter, 2008). Минимальные бактерицидные концентрации трёх коммерческих дезинфектантов на основе хлоргексидина, триклозана и хлорида бензалкония для 8 клинических изолятов *P. aeruginosa*, культивируемых в планктонной форме, оказались существенно ниже, чем рекомендуемые производителем концентрации дезинфектанта. Однако, те же рекомендуемые концентрации оказались неэффективны против биоплёнок: 4-80% клеток (результаты варьировали в зависимости от штамма и поверхности, на которой была образована биоплёнка) сохранили жизнеспособность после обработки хлоридом бензалкония, 30-80% – после обработки хлоргексидином и 20-80% – после обработки триклозаном. Исследование чувствительности панели

изолятов *S. aureus*, выделенных из инфицированных суставных имплантов, показало, что большая часть антибиотиков не способна полностью элиминировать биоплёнку ни одного из штаммов *S. aureus* даже в максимальной концентрации (Mandell *et al.*, 2019). Исключение составили рифампицин, доксициклин и даптомицин, но даже эти антибиотики требовали существенно больших доз для эрадикации биоплёнок по сравнению с планктонными клетками. Схожие результаты были получены и при исследовании штаммов *S. aureus*, полученных в НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии СГМУ (Babushkina *et al.*, 2021). В этой работе, помимо прочего, показано, что устойчивость биоплёнок *S. aureus* к антибиотикам зависит от степени зрелости биоплёнки: 48-ми часовые биоплёнки были существенно более устойчивы, чем 24-х часовые.

Существует также ряд работ, в которых сравниваются минимальная концентрация, необходимая для эрадикации биоплёнки (МКЭБ, Минимальная Концентрация Эрадикации Биоплёнки, в англоязычной литературе Minimal Biofilm Eradication Concentration, МВЕС) различных антибиотиков и их МИК, но не МБК (Ceri *et al.*, 1999; Černohorská, Votava, 2008; Moskowitz *et al.*, 2004; Sepandj *et al.*, 2007). Хотя, как правило, МКЭБ оказывается выше, чем МИК, такое сравнение представляется не вполне корректным. МИК показывает концентрацию антибиотика, которая подавляет дальнейшее размножение бактерий, но не гарантирует их полную элиминацию. МКЭБ показывает такую концентрацию антибиотика, после воздействия которой в биоплёнке не остается жизнеспособных бактерий, что для планктонных клеток скорее (хотя и не в полной мере) соответствует МБК. Очевидно, что МКЭБ почти всегда будет выше, чем МИК. Хотя это не говорит о большей устойчивости к антибиотикам бактерий в составе биоплёнок, это может быть важным с клинической точки зрения, поскольку дозы антибиотиков, используемые в клинической практике, рассчитываются на основе МИК, и могут быть неэффективны в случае инфекций, связанных с образованием биоплёнок.

1.7 Стратегии борьбы с биоплёнками

На настоящий момент на разных стадиях разработки находится большое количество разнообразных подходов к ингибированию и разрушению биоплёнок

патогенных микроорганизмов. В их число входят ингибиторы кворум-сенсинга и системы c-di-GMP сигналинга, ферменты, разрушающие матрикс биоплёнок, олиго- и полисахариды, муцины и амилоидные пептиды, антитела к специфическим компонентам биоплёнок, различные питательные соединения, выступающие в качестве модуляторов метаболизма бактериальных клеток, фотосенсибилизаторы, бактериофаги и антибактериальные лизины, наночастицы и наноструктурированные поверхности, устойчивые к образованию биоплёнок (таблица 1) (Koo *et al.*, 2017; Плакунов и др., 2017).

Таблица 1. Общие характеристики различных стратегий борьбы с биоплёнками патогенных микроорганизмов.

Стратегия	Активное соединение	Стоимость	Токсичность	Пути введения	Спектр действия	Активность в отношении планктонных клеток
Ингибирование кворум-сенсинга	Низкомолекулярные соединения	Зависит от соединения	Зависит от соединения	Зависит от соединения (потенциально пероральное, парентеральное, местное)	Зависит от соединения	Нет
Разрушение медиаторов кворум-сенсинга	Белок-фермент	Высокая	Возможна иммуногенность	Парентеральное или местное	Ограничен видами, использующими определённый тип медиаторов кворум-сенсинга	Нет
Нарушение взаимодействий матрикса: антитела и лектины	Белок	Высокая	Возможна иммуногенность и побочная активность	Парентеральное или местное	Ограничен видами, использующими конкретные компоненты матрикса	Нет
Нарушение взаимодействий матрикса: олиго- и полисахариды	Олиго- или полисахариды	Низкая	Низкая	Не ясно	Не ясно, вероятно зависит от механизма действия	Нет

Таблица 1. Продолжение.

Стратегия	Активное соединение	Стоимость	Токсичность	Пути введения	Спектр действия	Активность в отношении планктонных клеток
Нарушение взаимодействий матрикса: гидролитические фермента	Белок-фермент	Высокая	Возможна иммуногенность и побочная активность	Парентеральное или местное	Ограничен видами, использующими конкретные компоненты матрикса	Нет
Антибактериальные лизины	Белок-фермент	Высокая	Возможна иммуногенность	Парентеральное или местное	Ограничен видами с определённым химическим строением пептидогликана	Да
Наночастицы	Наночастицы металлов или антибиотики (при использовании наночастиц в качестве носителей)	Высокая	Потенциально высокая	Парентеральное или местное	Широкий	Да
Антимикробные пептиды	Пептиды или небольшие белки	Высокая	Относительно высокая	Парентеральное или местное	Широкий	Да

Таблица 1. Продолжение.

Стратегия	Активное соединение	Стоимость	Токсичность	Пути введения	Спектр действия	Активность в отношении планктонных клеток
Бактериофаги	Бактериофаги	Высокая	Возможна иммуногенность	Парентеральное или местное	Как правило, ограничен одним видом или некоторыми штаммами в пределах вида	Да
Физические методы	Низкотемпературная плазма; фотодинамическая терапия	Низкая	Зависит от метода	Местное	Широкий	Да
Стимулирование метаболической активности	Метаболиты и питательные вещества	Низкая	Низкая	Не ясно	Не ясно	Нет
Интервальное дозирование антибиотиков	Антибиотики	Низкая	Зависит от антибиотика	Зависит от антибиотика (потенциально пероральное, парентеральное, местное)	Зависит от антибиотика	Да

Процесс формирования и развития биоплёнок бактерий регулируется системами кворум-сенсинга. Так, *P. aeruginosa* обладает четырьмя взаимно регулируемыми системами кворум-сенсинга: las, rhl, PQS и IQS. Каждая из этих систем состоит из ферментов, синтезирующих низкомолекулярные вещества – так называемые аутоиндукторы, и рецепторов для соответствующих аутоиндукторов. При достижении определённой плотности бактерий концентрация секретируемых ими аутоиндукторов достигает пороговых значений, что приводит к изменению регуляции экспрессии генов и формированию биоплёнки. Каждая из систем кворум-сенсинга *P. aeruginosa* использует свой тип аутоиндукторов. Для системы las это N-3-оксодеканойл-L-гомосерин лактон (C12-HSL), в системе rhl используется N-бутирил-L-гомосерин лактон (C4-HSL), в системе PQS – 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон (PQS, *Pseudomonas* Quinolone Signal), а в системе IQS – 2-(2-гидроксифенил)-тиазол-4-карбальдегид (IQS, Integrated Quorum Sensing Signal) (Lee, Zhang, 2014). Все системы кворум-сенсинга взаимозависимы. В частности, активация LasR (рецептора 3O-C12-HSL) запускает транскрипцию RhlI, синтезирующей C4-HSL, при этом обе системы регулируют систему PQS, которая, в свою очередь, активирует систему *rhl* (Williams, Cámara, 2009). Согласно различным оценкам, от 1% до >10% генов *P. aeruginosa* находится под контролем кворум-сенсинга (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Whiteley *et al.*, 1999). Нарушение бактериальной коммуникации за счет ингибирования систем кворум-сенсинга активно исследуется как один из подходов для борьбы с бактериальными биоплёнками, и за последнее время было получено множество разнообразных соединений, способных ингибировать системы кворум-сенсинга бактерий. По механизму действия эти соединения можно разделить на две большие группы: соединения, подавляющие синтез аутоиндукторов или их связывание с рецепторами, и белки-ферменты, способные расщеплять или модифицировать аутоиндукторы. Показана возможность применения таких соединений не только в медицине, но также в различных отраслях сельского хозяйства и при обработке и очистке сточных вод (Kalia, 2013).

Внутриклеточной сигнальной молекулой, регулирующей переход от планктонного состояния к формированию биоплёнки, является циклический динуклеотид c-di-GMP (O'Toole, Ha, 2015). В бактериальной клетке c-di-GMP

синтезируется ферментами дигуанилат циклазами и расщепляется фосфодиэстеразами. Как правило, у бактерий имеется несколько белков, имеющих дигуанилат циклазные и/или фосфодиэстеразные домены и активирующихся в ответ на различные стимулы. Накопление c-di-GMP в клетке запускает программу образования биоплёнки, а его недостаток, наоборот, стимулирует процесс дисперсии биоплёнки. На настоящий момент описано несколько низкомолекулярных соединений, ингибирующих бактериальные дигуанилат циклазы или блокирующих взаимодействие c-di-GMP с его рецепторами и, как следствие, подавляющих образование и индуцирующих разрушение биоплёнок (Wu *et al.*, 2015). Кроме того, известным модулятором количества c-di-GMP является монооксид азота NO. Хотя применение газообразного NO в клинике представляется проблематичным, были разработаны соединения на основе диазениумдиолата, разлагающиеся с выделением NO, а также структурные аналоги NO. Эти соединения показали эффективность в отношении биоплёнок *P. aeruginosa*, а также *Escherichia coli* и *Haemophilus influenzae* (Koo *et al.*, 2017; Плакунов и др., 2017).

Матрикс биоплёнок, состоящий из полисахаридов, белков и внеклеточной ДНК, является одновременно связующим компонентом, который помогает бактериям оставаться в составе биоплёнки, и защитной составляющей, замедляющей проникновение некоторых антибиотиков и снижающей негативный эффект неспецифических дезинфицирующих агентов, таких как гипохлорит натрия или перекись водорода. В связи с этим матрикс является одной из основных мишеней для антибиоплёночных соединений. Одним из способов дезорганизации структуры матрикса биоплёнок является нарушение правильного взаимодействия между полимерными молекулами матрикса и/или молекулами матрикса и бактериальными клетками. В частности, белками, скрепляющими между собой молекулы полисахаридов матрикса биоплёнок *P. aeruginosa*, являются лектины CdrA, LecB и, вероятно, LecA. В настоящий момент активно разрабатываются блокаторы функций лектинов LecB и LecA. Лектин LecA и блокирующие его функции соединения подробнее описаны в последующих разделах.

Нарушить организацию матрикса и бактерий внутри биоплёнки также возможно за счет применения антител и лектинов, связывающихся с компонентами

матрикса, а также олиго- и полисахаридов. Например, моноклональные антитела к белкам DNABII, ассоциированным с внеклеточной ДНК матрикса биоплёнок, оказались способны разрушать биоплёнки различных видов патогенных бактерий, включая *P. aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *S. aureus* и *H. influenzae* (Novotny *et al.*, 2016). Их эффективность была показана не только *in vitro*, но и на животных моделях инфекции (Novotny *et al.*, 2016). Моноклональные антитела к полисахариду матрикса биоплёнок *P. aeruginosa* Psl подавляли адгезию бактерий на поверхности пластика, а также их агрегацию. Кроме того, они способствовали разрушению биоплёнок нейтрофилами, причём этот эффект усиливался при добавлении антибиотика меропенема (Ray *et al.*, 2017). Некоторые лектины различных растений и водорослей были способны ингибировать образование биоплёнок различных микроорганизмов, при этом эффект сильно зависел от конкретной комбинации лектин/микроорганизм, что, по всей видимости, обусловлено различиями в специфичности связывания лектинов и составе матрикса биоплёнок микроорганизмов (Vasconcelos *et al.*, 2014; Плакунов и др., 2017). Олиго- и полисахаридным ингибиторам образования биоплёнок посвящен отдельный раздел ниже.

Один из наиболее эффективных подходов к борьбе с биоплёнками патогенных микроорганизмов заключается в использовании гидролитических ферментов (Nahar *et al.*, 2018; Thorn *et al.*, 2021). Гидролитические ферменты можно разделить на два основных класса: антибактериальные лизины, расщепляющие пептидогликан клеточной стенки бактерий и обладающие бактерицидным эффектом, и ферменты, гидролизующие компоненты матрикса биоплёнок. Эти соединения описаны в разделах 1.12 и 1.13.

Среди подходов, направленных в первую очередь на резистентные к антибиотикам планктонные бактерии, но показавшие определённую эффективность и против биоплёнок, можно отметить использование различных наночастиц, антимикробных пептидов и бактериофагов.

Наночастицы из металлов и оксидов металлов, в первую очередь из серебра и оксида серебра, обладают выраженными бактерицидными свойствами и активны в том числе в отношении биоплёнок различных организмов. Адгезия бактерий к поверхностям, покрытым такими наночастицами, затруднена. Недостатком таких

наночастиц является их относительно высокая токсичность, что ограничивает их применение (Mi *et al.*, 2018). Липосомы, полимеросомы и твердые липидные наночастицы не обладают существенной бактерицидной активностью сами по себе, но могут быть использованы для доставки антибиотиков в биоплёнки, повышая их эффективность по сравнению со стандартными растворами антибиотиков (Koo *et al.*, 2017; Mi *et al.*, 2018). Эти частицы могут быть сделаны таким образом, чтобы высвободить инкапсулированные антибиотики только при определённых условиях, например, в заданном диапазоне pH (Koo *et al.*, 2017). Отдельно следует упомянуть со-полимерные наночастицы, состоящие из декстрана, (3-акриламидопропил) триметиламмония и бутилметакрилата. Эти наночастицы не обладали бактерицидным действием, однако проникали внутрь биоплёнок различных патогенных микроорганизмов и способствовали их разрушению, в том числе в экспериментах *in vivo* (Li *et al.*, 2018a).

Антимикробные пептиды представляют собой небольшие пептидные молекулы, как правило несущие положительный заряд и способные убивать бактериальные клетки посредством связывания с мембраной, её деполяризации и повышения проницаемости для других веществ. За счет такого механизма действия антимикробные пептиды эффективны не только в отношении метаболически активных бактерий, но также и клеток-персистеров. Благодаря этому они демонстрируют способность уничтожать бактериальные биоплёнки, в особенности при совместном применении с традиционными антибиотиками (Shahrour *et al.*, 2019). Интересно, что в некоторых случаях антимикробные пептиды, по-видимому, дополнительно воздействуют и на другие системы бактериальной клетки, подавляя экспрессию генов, контролируемых системами кворум-сенсинга, и генов, отвечающих за синтез матрикса биоплёнок, либо связывая вторичный бактериальный мессенджер ppGpp и вызывая его деградацию (Koo *et al.*, 2017; Shahrour *et al.*, 2019). На настоящий момент уже более 1200 антимикробных пептидов были протестированы на способность разрушать бактериальные биоплёнки или подавлять их образование (Shahrour *et al.*, 2019). Основными недостатками антимикробных пептидов является их высокая стоимость и относительно высокая токсичность.

Ещё одним популярным подходом, изначально направленным на борьбу с

антибиотико-резистентными штаммами, но привлекающим значительный интерес и с точки зрения борьбы с биоплёнками, являются бактериофаги. К сожалению, сами по себе бактериофаги достаточно неэффективны против бактериальных биоплёнок в силу различных причин, таких как затруднённая диффузия достаточно крупных фаговых частиц через матрикс биоплёнки, невысокая скорость размножения бактериофагов в метаболически неактивных клетках биоплёнок и распространение внутри биоплёнки устойчивых вариантов (Pires *et al.*, 2017). Повысить эффективность бактериофагов удастся за счет комбинированного применения с антибиотиками или использования коктейля из различных бактериофагов, но даже эти методы не гарантируют результат. В то же время интересным направлением является создание генетически модифицированных бактериофагов, несущих дополнительные гены, повышающие их эффективность против биоплёнок. Например, эффективность бактериофага T7 против биоплёнок была увеличена за счет добавления в геном фага гена дисперсина В – белка, разрушающего матрикс биоплёнок *E. coli*, и лактоназы – фермента, разрушающего задействованные в кворум-сенсинге гомосерин лактоны (Geredew Kifelew *et al.*, 2019; Lu, Collins, 2007; Pires *et al.*, 2017).

Отдельно необходимо упомянуть такие «физические» методы борьбы с биоплёнками, как воздействие низкотемпературной плазмой и фотодинамическая терапия. Бактерицидная активность обоих методов основана на генерации активных форм кислорода, повреждающих различные компоненты бактериальных клеток и матрикса биоплёнок (Gilmore *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018). В первом случае активные формы кислорода создаются благодаря обработке биоплёнки ионизированными газами (плазмой), во втором – при облучении биоплёнки видимым светом после добавления специальных фотоактивных соединений – фотосенсибилизаторов. При обработке плазмой критическим параметром является толщина биоплёнки, поскольку глубина проникновения плазмы ограничена (Gilmore *et al.*, 2018). При фотодинамической терапии вещества-фотосенсибилизаторы могут проникать вглубь биоплёнки, а некоторые подобные соединения – в том числе и внутрь бактерий, что увеличивает их эффективность (Hu *et al.*, 2018). К сожалению, оба метода ограничены местным применением.

Ещё один интересный подход к борьбе с биоплёнками, принципиально

отличный от описанных выше, заключается в повышении чувствительности бактерий внутри биоплёнки к антибиотикам за счет стимулирования их метаболической активности. Поскольку внутри биоплёнки формируются условия недостатка кислорода и питательных веществ, бактерии в глубине биоплёнки снижают свою метаболическую активность, что в свою очередь приводит к снижению их чувствительности к антибиотикам. Было показано, что добавление в среду таких соединений, как глюкоза, маннитол, пируват, а также некоторых аминокислот, стимулирует процессы аэробного дыхания, генерацию NADH, увеличение мембранного потенциала и, вследствие этого, поглощение клеткой аминогликозидных антибиотиков (Crabbé *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019). Аналогичный эффект оказывает ингибирование альтернативных метаболических путей, например, глиоксилатного цикла (Crabbé *et al.*, 2019). Кроме того, добавление аминокислоты серина усиливает влияние фторхинолонов как на активно делящиеся бактериальные клетки, так и на клетки-персистеры (Duan *et al.*, 2016). Предположительно, это связано с повышенной продукцией активных форм кислорода в присутствии избытка серина (Duan *et al.*, 2016). Повышение концентрации кислорода также способствует переходу бактерий внутри биоплёнки к активному метаболизму и стимулирует действие антибиотиков. В частности, было показано, что гипербарическая оксигенация повышает чувствительность бактериальных биоплёнок к ципрофлоксацину и тобрамицину, в том числе в экспериментах *in vivo* (Crabbé *et al.*, 2019).

Наконец, значительно повысить эффективность стандартных антибиотиков в отношении биоплёнок оказалось возможным за счет тщательного подбора антибиотиков, их количества и периодичности применения (Meuer *et al.*, 2020; Müsken *et al.*, 2018). Как правило, при обработке биоплёнок антибиотиками субпопуляция метаболически-активных бактерий погибает, в то время как неактивные клетки-персистеры остаются жизнеспособными и могут заново заселить биоплёнку после удаления антибиотика из среды. При этом клетки-персистеры начинают активно делиться и, таким образом, становятся чувствительными к антибиотикам. При синхронизации времени обработки биоплёнок антибиотиками с временем, необходимым клеткам-персистерам для перехода в метаболически-

активную форму, удастся элиминировать значительную их часть. Таким образом, интервальное дозирование антибиотиков позволяет добиться гораздо большего эффекта в отношении биоплёнок по сравнению с непрерывным дозированием (Meyer *et al.*, 2020; Müsken *et al.*, 2018).

Важно отметить, что многие из описанных подходов направлены исключительно на разрушение или подавление образования биоплёнок и сами по себе не обладают непосредственным бактерицидным эффектом. При клиническом применении, однако, это может привести к попаданию бактерий из разрушенной биоплёнки в кровоток, диссеминации инфекции и развитию бактериемии (Fleming, Rumbaugh, 2018; Wille, Coenye, 2020; Плакунов и др., 2017). В связи с этим все подобные подходы должны рассматриваться исключительно как дополнение к традиционной антибиотикотерапии.

В данной работе была предпринята попытка исследовать некоторые природные олиго- и полисахариды – потенциальные блокаторы лектина LecA – с точки зрения их применимости для борьбы с биоплёнками *P. aeruginosa*, а также эффективность комбинации гидролитических ферментов лизостафина и дисперсина В – в отношении биоплёнок *S. aureus*.

1.8 Лектин LecA *P. aeruginosa*

Лектин LecA (также встречается название PA-IL) является одним из белков *P. aeruginosa*, участвующих в формировании биоплёнок. LecA связывает мономерную галактозу и концевые остатки галактозы в олиго- и полисахаридах и является мишенью для разработки соединений – ингибиторов образования биоплёнок.

Лектин LecA был впервые обнаружен и выделен в 1970-х годах как фактор, вызывающий агглютинацию эритроцитов человека и различных животных (Gilboa-Garber, 1972; Gilboa-Garber, 1982). LecA представляет собой небольшой белок, состоящий из 121 аминокислотного остатка (молекулярный вес 12.8 кДа) (Avichezer *et al.*, 1992). Ген *lecA* имеется у большинства штаммов *P. aeruginosa*. В частности, из 304 полных протеомов различных штаммов *P. aeruginosa*, имеющихся в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>) по состоянию на 7 июня 2022 года, LecA

присутствует в 296-х. Анализ 147 штаммов *P. aeruginosa*, среди которых были как клинические изоляты, так и изоляты, выделенные из окружающей среды, показал, что 141 из них несет функциональный ген *lecA*, при этом в подавляющем большинстве случаев последовательности лектина не имеют функционально значимых аминокислотных замен (Boukerb *et al.*, 2016). Ген *lecA* полностью отсутствует у штамма PA7, значительно отличающегося от референсного штамма PAO1 по многим другим признакам, и у родственных ему штаммов (Boukerb *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2010). Интересно, что этот белок не встречается у других видов рода *Pseudomonas*, однако белки, гомологичные LecA, обнаруживаются у небольшого количества неродственных *P. aeruginosa* бактерий. Поиск с помощью программы BLAST по банку данных UniProt позволяет обнаружить белки, гомологичные LecA, у нескольких видов бактерий родов *Xenorhabdus* и *Photorhabdus*, а также *Saccharothrix espanaensis*, *Jejubacter calystegiae*, *Paramesorhizobium deserti* и гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* (поиск по референсным протеомам UniprotKB, 03.06.2022). Вероятно, ген *lecA* был получен *P. aeruginosa* в результате горизонтального переноса, например, от бактерий рода *Xenorhabdus* – симбионтов энтомопатогенных нематод.

Архитектура белковой глобулы LecA представляет собой антипараллельный β -сэндвич. LecA образует гомотетрамерные комплексы, где каждый из мономеров имеет свой сайт связывания лиганда, то есть один тетрамер способен связывать 4 молекулы лиганда, при этом сайты связывания в тетрамере LecA полностью независимы (Cioici *et al.*, 2003) (рис. 4А). Важной чертой сайта связывания галактозы лектина LecA является наличие иона кальция, фиксированного координационными связями с карбоксильными группами белка и необходимого для взаимодействия с галактозой (рис. 4Б). Константа диссоциации комплекса LecA с галактозой равна 88 мкМ (Kadam *et al.*, 2011). Лектин также связывается с производными галактозы, такими как изопропил-тиогалактозид (ИПТГ), нитрофенил-галактозид и галактозамин, и олиго- и полисахаридами, содержащими концевые невосстанавливающие остатки α -D-галактозы, например, с антигенами групп крови B, P^k и P₁ (Chen *et al.*, 1998; Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Lanne *et al.*, 1994). При этом концевой остаток галактозы играет ключевую роль в связывании олигосахаридов, другие остатки олигосахарида практически не участвуют во взаимодействии (Blanchard *et al.*, 2008; Nurisso *et al.*,

2010). В связи с этим константы диссоциации различных олигосахаридов к LecA мало отличаются от константы диссоциации мономерной галактозы и варьируют от 30 до 130 мкМ (Blanchard *et al.*, 2008; Nurisso *et al.*, 2010).

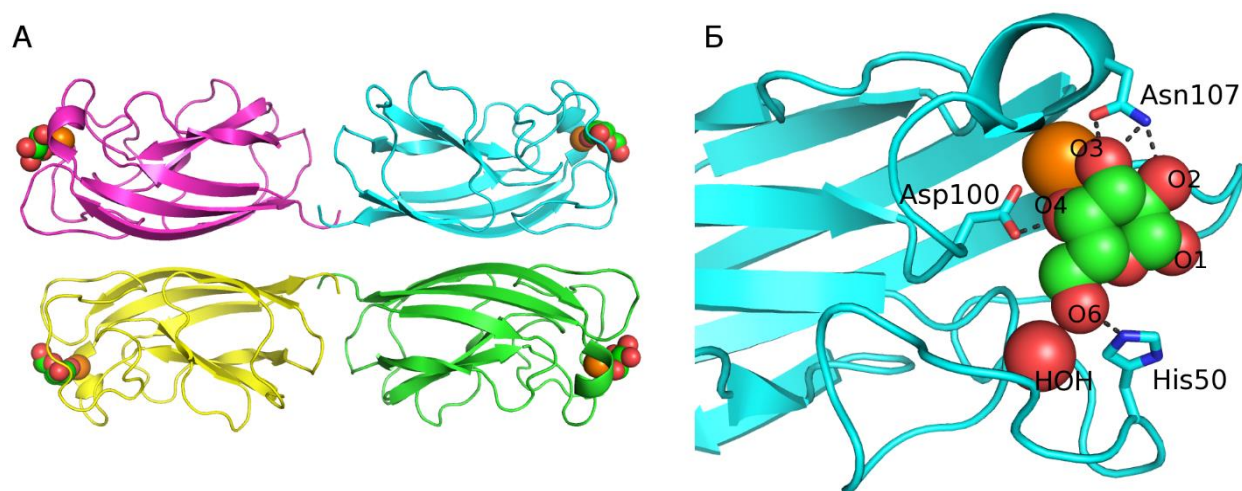


Рисунок 4. Трёхмерная структура лектина LecA. (А) Общая структура тетрамера лектина LecA; мономеры лектина показаны в виде ленточной модели, цветами обозначены разные мономеры в составе тетрамера; атомы молекул галактозы показаны в виде сфер. (Б) Структура сайта связывания лектина LecA в комплексе с молекулой галактозы; лектин показан в виде ленточной модели и покрашен бирюзовым; отдельно показаны аминокислотные остатки, непосредственно взаимодействующие с галактозой; атомы галактозы показаны в виде сфер зелёного (углерод) и красного (кислород) цветов; атом кальция показан в виде сферы оранжевого цвета; молекула воды, участвующая в связывании галактозы, показана в виде сферы красного цвета. Рисунок цитирован по (Гришин и др., 2015).

В основе регуляции экспрессии гена *lecA*, как и многих других факторов вирулентности *P. aeruginosa*, лежит комплекс систем кворум-сенсинга. При культивировании *P. aeruginosa in vitro* в планктонной форме лектин LecA начинает продуцироваться в начале стационарной фазы роста. Лектин не продуцируется в культуре мутанта, дефектного по системе кворум-сенсинга *rhl*, однако мутации, инактивирующие систему *las*, только задерживают начало продукции LecA, но не подавляют её полностью (Winzer *et al.*, 2000). Помимо системы *rhl*, для синтеза LecA необходимо наличие функционального сигма-фактора RpoS (σ^S) – одного из регуляторов ответа на стресс (Winzer *et al.*, 2000), а также функциональная система PQS (Diggle *et al.*, 2003).

In vivo продукция LecA стимулируется не только при достижении популяцией бактерий определённой плотности. Известно, что патогенные бактерии, в том числе *P. aeruginosa*, могут обнаруживать присутствие некоторых сигнальных молекул организма-хозяина, свидетельствующих о его стрессовом состоянии, и активировать в ответ на это гены, связанные с вирулентностью (Lesouhaitier, Feuilloley, 2012). *P. aeruginosa* способен непосредственно детектировать IFN- γ – цитокин, играющий важную роль в защите от патогенов (Wu *et al.*, 2005), морфин и другие опиоиды, накапливающиеся в кишечнике (откуда часто начинается инвазия *P. aeruginosa*) при его повреждениях и в крови при сепсисе (Zaborina *et al.*, 2007; Babrowski *et al.*, 2012; Zaborin *et al.*, 2012). Бактерии реагируют на присутствие этих веществ увеличением продукции факторов вирулентности, в частности, LecA. Кроме того, отмечено, что повышенный уровень продукции LecA коррелирует с увеличением вирулентности штаммов *P. aeruginosa* (Hickey *et al.*, 2018).

1.9 Функции LecA

Основная функция LecA на настоящий момент неизвестна. В разных работах было показано, что он может быть вовлечен в агрегацию бактерий и образование биоплёнок, в адгезию бактерий к клеткам человека, а также обладать токсическим действием в отношении эпителиальных клеток.

1.9.1 Биоплёнки

LecA играет роль в образовании биоплёнок *P. aeruginosa* PAO1, что было продемонстрировано как на мутантах по гену *lecA*, так и с помощью воздействия на биоплёнки специфическими лигандами LecA. В работе Diggle *et al.* 2006 было продемонстрировано, что штамм PAO1, мутантный по гену *lecA*, значительно хуже формировал биоплёнки на стальных купонах по сравнению с диким типом (Diggle *et al.*, 2006). Биоплёнки *lecA*⁻ мутанта содержали в два раза меньше биомассы, были на 30% тоньше и покрывали на 40% меньшую площадь. Напротив, мутант, гиперпродуцирующий LecA, формировал более плотные биоплёнки с большим количеством биомассы, покрывающие большую площадь. В той же работе было показано, что добавление ИПТГ или нитрофенил-галактозида не только подавляло

формирование биоплёнок PAO1 до уровня *lecA*⁻ мутанта, но и способствовало частичному разрушению уже сформированных биоплёнок. Похожие результаты, показывающие сниженную способность образовывать биоплёнку у *lecA*⁻ мутантов, были получены и другими авторами (Johansson *et al.*, 2008; Ligeour *et al.*, 2015a; Wagner *et al.*, 2017). Кроме того, множество работ описывает подавление образования биоплёнок *P. aeruginosa* различными соединениями, специфически связывающимися с LecA (Kadam *et al.*, 2011; Bergmann *et al.*, 2015; Flockton *et al.*, 2019; Kadam *et al.*, 2013b; Palmioli *et al.*, 2019; Smadhi *et al.*, 2014; Visini *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2019).

К сожалению, непосредственная роль LecA в процессе формирования биоплёнок *P. aeruginosa* остается не выясненной. Вероятно, LecA способствует агрегации бактериальных клеток и формированию микроколоний благодаря своей мультивалентной структуре и взаимодействию с липополисахаридом (Diggle *et al.*, 2006). В этой связи можно отметить, что на модельных везикулах была продемонстрирована принципиальная способность LecA соединять отдельные везикулы с образованием кластеров, напоминающих бактериальные микроколонии (Villringer *et al.*, 2018).

1.9.2 Взаимодействие с эпителиальными клетками

По всей видимости, помимо участия в образовании биоплёнок, LecA также вовлечен во взаимодействие бактерий с эпителиальными клетками (Imberty *et al.*, 2004), вероятно, за счет своей способности связываться с различными олигосахаридами гликопротеинов и гликолипидов, встречающихся на поверхности клеток человека (Blanchard *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 1998; Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Kirkeby *et al.*, 2006; Kirkeby *et al.*, 2007; Lanne *et al.*, 1994; Patil *et al.*, 2022). Было показано, что LecA замедляет рост культуры клеток эпителия дыхательных путей человека, уменьшает количество клеток, несущих реснички, а также снижает частоту биения ресничек (Gustke *et al.*, 2012; Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994; Mewe *et al.*, 2005). Добавление LecA к культурам клеток эпителия кишечника Caco-2 и T-84 повышает проницаемость монослоя клеток (Alverdy *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003; Laughlin *et al.*, 2000), причём схожий эффект также наблюдается *in vivo* на мышинной модели кишечной инфекции (Alverdy *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003; Laughlin *et al.*, 2000).

Связывание LecA с мембраной эпителиальных клеток приводит к кластеризации фосфатидилинозитол-трифосфата, белков флотиллинов и CD59, фосфорилированию и активации некоторых внутриклеточных белков (Brandel *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2017). Кроме того, LecA способствует адгезии *P. aeruginosa* к эпителиальным клеткам дыхательных путей человека линии A549 (Chemani *et al.*, 2009), а также инвазии *P. aeruginosa* внутрь искусственных мембранных везикул и эпителиальных клеток (Brandel *et al.*, 2021; Eierhoff *et al.*, 2014).

1.10 Блокаторы LecA

За последние пятнадцать лет было описано большое количество блокаторов LecA. В первую очередь это различные синтетические мультивалентные соединения, несущие концевые остатки галактозы, моновалентные производные галактозы, а также некоторые природные соединения.

1.10.1 Моновалентные соединения

подавляющее большинство идентифицированных на настоящий момент моновалентных блокаторов LecA – производные галактозы. Гидрофобные заместители по первому атому кислорода несколько увеличивают сродство галактозы к LecA. Так, метил- α -D-галактозид и метил- β -D-галактозид обладают чуть большей аффинностью к LecA, чем немодифицированная D-галактоза, а константа диссоциации ИПТГ почти в три раза меньше, чем D-галактозы (Kadam *et al.*, 2011; Garber *et al.*, 1992). Ещё большее увеличение силы взаимодействия галактозы с LecA можно получить путем введения ароматических заместителей (Cecioni *et al.*, 2012; Gening *et al.*, 2013; Kadam *et al.*, 2013a; Rodrigue *et al.*, 2013; Bruneau *et al.*, 2023). Подобные соединения, например, фенил-галактозид, фенил-тиогалактозид и бензофенон-тиогалактозид, связываются с LecA с константой диссоциации в диапазоне 1-10 мкМ, при том, что константа диссоциации D-галактозы составляет около 90 мкМ (Kadam *et al.*, 2013a, Bruneau *et al.*, 2023). Этот эффект объясняется образованием так называемой СН- π связи между системой π -электронов ароматического кольца и атомом водорода при ϵ -углероде гистидина 50 LecA. Такая связь аналогична водородной связи с тем исключением, что роль акцептора протона

играет система π -электронов. Наличие этого взаимодействия в комплексах LecA с ароматическими галактозидами было подтверждено кристаллическими структурами комплексов (Kadam *et al.*, 2013a). Ещё один дополнительный сайт для взаимодействия с потенциальными блокаторами был обнаружен на интерфейсе взаимодействия мономеров LecA (Siebs *et al.*, 2021). Были описаны блокаторы LecA – производные галактозы, способные одновременно взаимодействовать с сайтом связывания галактозы и полостью между доменами LecA (Siebs *et al.*, 2021). К сожалению, подобный подход пока не позволил получить соединения с более высокой аффинностью к LecA.

Интересный альтернативный подход заключается в создании производных галактозы, несущих эпокси-группу, за счет чего они способны ковалентно связываться с LecA после формирования комплекса (Wagner *et al.*, 2017). Такой ковалентно связывающийся лиганд LecA, конъюгированный с флуоресцентной меткой, был использован для визуализации биоплёнок *P. aeruginosa*, однако его способность ингибировать их образование не описана.

Недавно были также получены блокаторы LecA неуглеводной природы. В частности, с помощью виртуального скрининга был отобран изобутирил-катехол, в экспериментах показавший слабую способность нарушать взаимодействие LecA с флуоресцентным производным галактозы. Дальнейшие исследования позволили получить более активные производные катехола, самым эффективным из которых оказался нитрокатехол с константой диссоциации 560 мкМ (Kuhaudomlarp *et al.*, 2021). В другой работе виртуальный скрининг не дал результатов, однако авторам удалось идентифицировать соединение, имеющее в своем составе гидроксамовую кислоту в качестве функциональной группы (группы, непосредственно связывающейся с ионом кальция в сайте связывания LecA) с помощью экспериментального скрининга библиотеки соединений, известных своей способностью хелатировать металлы. Авторы синтезировали несколько производных исходного соединения, их аффинности к LecA находились в диапазоне 3.6-7.2 мМ (Shanina *et al.*, 2022). Таким образом, хотя принципиальная возможность создания блокаторов LecA неуглеводной природы существует, все полученные на настоящий

момент неуглеводные соединения обладают чрезвычайно низкой аффинностью к LecA.

1.10.2 Мультивалентные соединения

Подавляющее большинство лектинов, как и LecA, связывают моносахара с достаточно низкой аффинностью (Dam, Brewer, 2002). Чтобы компенсировать этот недостаток, как лектины, так и их лиганды обладают свойством мультивалентности, то есть содержат в составе одной молекулы или молекулярного комплекса (белка-лектина или лиганда-гликопротеина) несколько одинаковых сайтов связывания (Dam, Brewer, 2010). Мультивалентность обеспечивает существенное увеличение аффинности и специфичности лектинов к своим природным лигандам благодаря двум механизмам: «bridging» и «statistical rebinding» (Wittmann, Pieters, 2013) (рис. 5). В первом случае наличие у мультивалентного лектина и мультивалентного лиганда нескольких сайтов взаимодействия позволяет сформировать более прочный комплекс за счет одновременного связывания лектином всех (или части) эпитопов лиганда. Такой тип мультивалентного взаимодействия называется также хелатирующим. Во втором случае наличие нескольких сайтов связывания на одной молекуле лектина или лиганда повышает их локальную концентрацию, за счет чего после диссоциации комплекса повышается вероятность того, что комплекс сформируется снова. Необходимо отметить, что эти механизмы не являются взаимоисключающими и могут действовать одновременно.

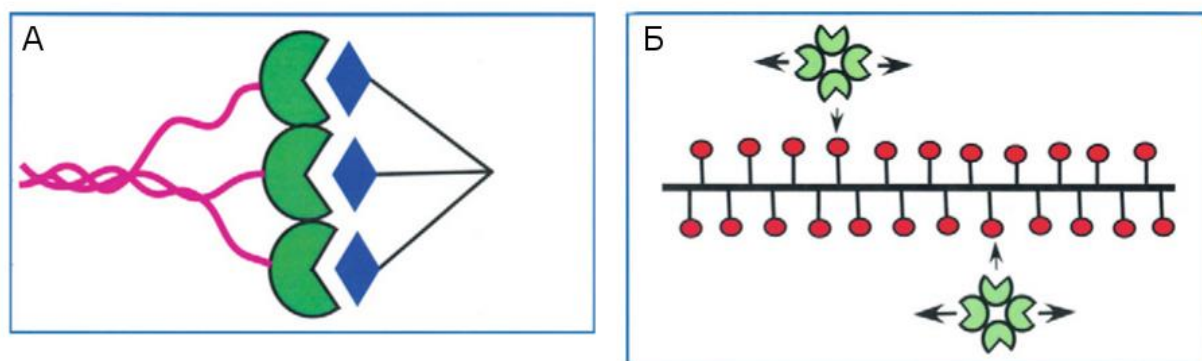


Рисунок 5. Механизмы увеличения аффинности молекулярных взаимодействий за счет мультивалентности. (А) Хелатирующее или «bridging» взаимодействие, при котором аффинность мультивалентного взаимодействия увеличивается за счет одновременного связывания нескольких лигандом низкоаффинных сайтов рецептора. (Б) Связывание по типу «statistical rebinding», при котором аффинность мультивалентного взаимодействия увеличивается за счет увеличения локальной концентрации сайтов рецептора. Зеленые окружности с вырезанными секторами обозначают рецепторы, синие ромбы и красные круги – лиганды. Рисунок цитирован по (Dam, Brewer, 2010).

За последнее десятилетие LecA стал своего рода модельным объектом для разработки мультивалентных соединений – блокаторов лектинов, в связи с чем было синтезировано большое количество разнообразных галактозилированных соединений, способных связываться с LecA. Были описаны гликокластеры на основе каликсаренов и резорцинаренов (Cecioni *et al.*, 2009; Cecioni *et al.*, 2011a; Cecioni *et al.*, 2012; Soomro *et al.*, 2011), линейных и циклических β -пептоидов, порфирина (Cecioni *et al.*, 2011a), конденсированных ароматических соединений и фуллеренов (Cecioni *et al.*, 2011b; Donnier-Maréchal *et al.*, 2017), галловой кислоты и пентаэритритола (Malinovská *et al.*, 2019, Csávás *et al.*, 2022), цикло-олигосахаридов и моносахаридов (Angeli *et al.*, 2017a; Gening *et al.*, 2013; Ligeour *et al.*, 2015a; Wang *et al.*, 2016), ионов переходных металлов (O'Reilly *et al.*, 2021); функционализированные остатками галактозы полифенилацетиленовые полимеры (Otsuka *et al.*, 2010), мицеллы и липосомы (Metelkina *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2017), полимерные и золотые наночастицы (Flockton *et al.*, 2019; Reynolds *et al.*, 2012), дендримеры пептидной (Kadam *et al.*, 2011; Bergmann *et al.*, 2015; Kadam *et al.*, 2013b; Visini *et al.*, 2015) и не-пептидной природы (Bini *et al.*, 2016; Chabre *et al.*, 2011; Gerland *et al.*, 2014; Palmioli *et al.*, 2019), а также

различные дивалентные соединения (Huang *et al.*, 2018; Pertici, Pieters, 2012; Yu *et al.*, 2019; Zahorska *et al.*, 2020).

За счет мультивалентности оказалось возможным добиться существенного увеличения аффинности различных галактозилированных соединений к LecA. Интересно, что наибольшего прироста аффинности в пересчете на один остаток галактозы удалось добиться за счет дивалентных соединений. Например, соединение, содержащее два остатка галактозы, соединённых линкером из чередующихся остатков глюкозы и триазола, имело константу диссоциации с LecA, равную 28 нМ, что в пересчете на один остаток в 1250 раз меньше, чем константа диссоциации галактозы (Pertici *et al.*, 2013). Добавление в состав линкера бензольного кольца позволило ещё больше повысить аффинность, получив константу диссоциации 12 нМ (Yu *et al.*, 2019). Сравнимой аффинности (10.8 нМ) удалось добиться при использовании линкера на основе бензальдегида (Zahorska *et al.*, 2020). Ещё одно дивалентное соединение со сложной структурой, синтезированное другой группой исследователей, имело константу диссоциации с LecA 22 нМ (Angeli *et al.*, 2017b). По-видимому, такое преимущество дивалентных соединений обусловлено тем, что в данном случае задействован хелатирующий («bridging») механизм мультивалентного связывания. Действительно, трёхмерная структура тетрамера LecA такова, что только два сайта из четырёх могут быть одновременно связаны одним низкомолекулярным соединением. Два других сайта находятся на противоположной стороне тетрамерного комплекса и крайне труднодоступны для связывания.

Соединения с большей валентностью могут иметь аналогичную аффинность к LecA, но из-за наличия большего количества остатков галактозы прирост аффинности в пересчете на мономер ниже. Так, тетравалентный гликокластер, описанный в работе Wang *et al.*, 2016, имел константу диссоциации с LecA 19 нМ (Wang *et al.*, 2016), а 16-валентный пептидный гликокластер, описанный в Goyard *et al.* 2019, 2019 – 14 нМ (Goyard *et al.*, 2019). Однако большая часть блокаторов LecA, имеющих более двух остатков галактозы, обладает аффинностью порядка 80-150 нМ (Kadam *et al.*, 2011; Boukerb *et al.*, 2014; Cecioni *et al.*, 2012; Donnier-Maréchal *et al.*, 2017; Gening *et al.*, 2013; Ligeour *et al.*, 2015b). Для части из них, вероятно, невозможно одновременное связывание двух сайтов одного тетрамера LecA и увеличение аффинности

происходит за счет менее эффективного механизма «statistical rebinding». Кроме того, при одновременном связывании двух или более тетрамеров LecA одной молекулой мультивалентного блокатора могут играть роль стерические ограничения, связанные с достаточно большим размером тетрамера LecA по сравнению с молекулой блокатора. В связи с этим интересно отметить, что тетравалентный аналог упомянутого выше высокоаффинного дивалентного блокатора, имеющего константу диссоциации 12 нМ, связывался с LecA в 5 раз слабее (Yu *et al.*, 2019b; Yu *et al.*, 2019). По всей видимости, критически важной оказывается химическая и пространственная структура гликокластера, причём как его центральной части, так и линкеров, через которые остатки галактозы соединяются с центральной частью. Это подтверждается и исследованиями комплексов различных гликокластеров с LecA с помощью атомной силовой микроскопии (АСМ) (Zuttion *et al.*, 2019).

Часть разработанных блокаторов LecA была протестирована на способность подавлять образование биоплёнок, разрушать сформированные биоплёнки, либо ингибировать адгезию бактерий к эпителиальным клеткам. Впервые подавление образования биоплёнок мультивалентными блокаторами LecA было показано в случае с галактозилированными пептидными дендримерами (Kadam *et al.*, 2011). Тетравалентный пептидный дендример GalAG2 в концентрации 5 мкМ подавлял образование биоплёнок *P. aeruginosa* на стальных пластинках практически до уровня контроля. При этом двухвалентный аналог был существенно менее активен, а моновалентный аналог не оказывал на образование биоплёнок никакого влияния. В опытах по разрушению сформированной биоплёнки GalAG2 уменьшал биомассу биоплёнок только на 40%, но за счет оптимизации аминокислотной последовательности дендримера этот показатель удалось повысить до 80% (Kadam *et al.*, 2013b). Увеличение валентности дендримера до восьми остатков галактозы позволило добиться полного разрушения сформированных биоплёнок (Bergmann *et al.*, 2015). Другой блокатор LecA, эффективно подавляющий формирование биоплёнок *P. aeruginosa* – тетравалентное соединение, состоящее из двух дивалентных соединений на основе глюкозы и триазола, соединённых линкером из полиэтиленгликоля (Yu *et al.*, 2019b). Около 100 мкМ этого соединения практически полностью предотвращали образование биоплёнок и способствовали ~80%-му

разрушению уже сформированных биоплёнок. Гораздо большие концентрации – 5 мМ – требовались моновалентному бензофенон-тиогалактозиду (Bruneau *et al.*, 2023), трёхвалентным гликокластерам на основе тритиотриазина (Smadhi *et al.*, 2014), четырёхвалентным гликокластерам на основе каликс[4]аренов (Boukerb *et al.*, 2014) и четырёхвалентным гликокластерам на основе ионов рутения (O'Reilly *et al.*, 2021) для подавления образования биоплёнок *P. aeruginosa* в 24-х луночных планшетах. Интересно, что прямой зависимости между аффинностью мультивалентных блокаторов к LecA и их эффективностью против биоплёнок *P. aeruginosa*, по-видимому, нет. Так, отмеченные выше гликокластеры на основе каликс[4]аренов, обладающие активностью в отношении биоплёнок только в концентрации 5 мМ, обладали достаточно высокой аффинностью к LecA (176 нМ) (Boukerb *et al.*, 2014). Аналогичным образом, тетравалентные галактозилированные гликокластеры на основе маннозы имели константы диссоциации с LecA, сравнимые с пептидными дендримерами (150-200 нМ), однако подавляли образование биоплёнок только на 40% в концентрации 100 мкМ (Ligeour *et al.*, 2015a). Такой же уровень ингибирования биоплёнок был показан для 18-валентных гликокластеров в концентрации 40 мкМ (Palmioli *et al.*, 2019). Помимо различных гликокластеров, в одной работе было показано, что полимерные наночастицы, функционализированные галактозой, также способны эффективно подавлять формирование биоплёнок: концентрации порядка 20 мкМ в пересчете на остатки галактозы оказалось достаточно для достижения практически полного отсутствия накопления биомассы в 96-луночных планшетах (Flockton *et al.*, 2019).

Четырёхвалентные галактозилированные гликокластеры на основе каликс[4]аренов, описанные в работе Boukerb *et al.* 2014 (Boukerb *et al.*, 2014), также вызывали агрегацию клеток *P. aeruginosa* и препятствовали адгезии бактерий к эпителиальным клеткам. Способностью подавлять адгезию бактерий к клеткам бронхиального эпителия обладали и гликокластеры на основе галловой кислоты и пентаэритритола (Malinovská *et al.*, 2019).

Несмотря на множество работ *in vitro*, эффективность *in vivo* была исследована только для гликокластеров на основе каликс[4]аренов (Boukerb *et al.*, 2014). В модели острой легочной инфекции у мышей было показано, что ингаляция этим соединением

в концентрации 5 мМ снижает обсеменённость легких мышей, инфицированных *P. aeruginosa*, в 10 раз.

Важно отметить, что в некоторых случаях действие мультивалентных блокаторов LecA может быть несколько сложнее, чем просто подавление взаимодействия лектина с его природными лигандами. Так, гликокластеры на основе каликс[4]аренов с одинаковой эффективностью подавляли образование биоплёнок как исходным штаммом *P. aeruginosa* PAO1, так и вариантом, мутантным по гену *lecA*, хотя и не вызывали агрегации последнего. Точно так же гликокластеры, исследованные в работе Zuttion *et al.* 2018 (Zuttion *et al.*, 2018) препятствовали взаимодействию между *P. aeruginosa* и эпителиальными клетками человека вне зависимости от наличия функционального гена *lecA*. По всей видимости, механизм действия некоторых мультивалентных блокаторов LecA может быть связан с каким-то неспецифичным действием, либо действием на другие, пока не описанные лектины *P. aeruginosa*.

1.10.3 Лиганды LecA для таргетирования антибактериальных соединений

Другим интересным подходом к использованию соединений, специфически взаимодействующих с лектином LecA, является создание на их основе антибиотиков, целенаправленно накапливающихся в биоплёнках. Например, конъюгация галактозы с антибиотиком ципрофлоксацином не помешала связыванию с LecA и способствовала аккумуляции антибиотика внутри биоплёнок *P. aeruginosa*. К сожалению, при этом снизилась эффективность ингибирования гиразы – мишени ципрофлоксацина, что привело к существенному увеличению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) конъюгатов в отношении *P. aeruginosa* (Meiers *et al.*, 2020). Эта проблема была решена за счет использования пептидного линкера между остатком галактозы и антибиотиком, который содержал сайт гидролиза секретлируемой *P. aeruginosa* протеазы LasB (Meiers *et al.*, 2022). В другой работе использовались золотые наночастицы, функционализированные галактозой и фукозой (Zhang *et al.*, 2020). Роль антибактериального соединения в этой работе выполняли собственно наночастицы, проявляющие бактерицидную активность при облучении светом за счет фотодинамического и фототермического эффектов. Для повышения

антибактериального эффекта наночастицы были дополнительно нагружены антибиотиком цефтазидимом (Zhang *et al.*, 2020).

1.11 Полисахариды и олигосахариды – ингибиторы образования биоплёнок

В литературе описан только один олигосахарид, подавляющий образование биоплёнок *P. aeruginosa* – OligoG, получаемый за счет контролируемого гидролиза альгината бурых водорослей *Laminaria hyperborea*. Основной эффект, оказываемый OligoG на бактерии, заключается в повышении их чувствительности к антибиотикам, в особенности в случае антибиотикорезистентных штаммов (Khan *et al.*, 2012). Однако этот олигосахарид также способен подавлять образование биоплёнок мукоидными (синтезирующими альгинат в качестве матриксного полисахарида биоплёнок) штаммами *P. aeruginosa* и разрушать уже сформированные биоплёнки (Powell *et al.*, 2018). Механизм, за счет которого OligoG влияет на биоплёнки *P. aeruginosa*, не известен, однако авторы предполагают, что этот олигосахарид может нарушать взаимодействие между компонентами матрикса биоплёнок, в особенности внеклеточной ДНК, за счет хелатирования ионов кальция и магния.

В противоположность олигосахаридам, количество полисахаридов, влияющих на образование биоплёнок различными бактериями, достаточно велико (таблица 2). Способность полисахаридов ингибировать бактериальные биоплёнки была впервые продемонстрирована в 2006 г. в работе Valle *et al.*, 2006 (Valle *et al.*, 2006). Авторы показали, что капсульный полисахарид группы II, выделенный из культуры *E. coli*, подавлял формирование биоплёнок нескольких видов патогенных бактерий, таких как *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* и *E. faecalis*. В дальнейшем было обнаружено, что многие другие полисахариды как бактериального, так и эукариотического происхождения способны оказывать эффект на образование или разрушение биоплёнок. В частности, многие виды бактерий, встречающиеся в морской воде, продуцируют подобные полисахариды (Беседнова и др., 2016), что было показано для *Vibrio* spp. (Jiang *et al.*, 2011), *Streptococcus phocae* (Kanmani *et al.*, 2011), *Bacillus licheniformis* (Spanò *et al.*, 2016; Sayem *et al.*, 2011), *Pseudomonas stutzeri* (Wu *et al.*, 2016), *Pseudoalteromonas ulvae* (Brian-Jaisson *et al.*, 2016),

Pseudoalteromonas haloplanktis (Papa *et al.*, 2013) и некоторых других (Kanmani *et al.*, 2013; Kavita *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Pradeera *et al.*, 2016). Другим источником полисахаридов, оказывающих влияние на образование и разрушение биоплёнок, оказались капсулы и матрикс биоплёнок патогенных бактерий. Помимо капсульных полисахаридов *E. coli*, на биоплёнки способны влиять капсульные полисахариды *K. pneumoniae* (Santos Goncalves Dos *et al.*, 2014), полисахариды матрикса биоплёнок *P. aeruginosa* (Qin *et al.*, 2009), *Kingella kingae* (Bendaoud *et al.*, 2011), *E. coli* (Rendueles *et al.*, 2011) и *Pandoraea pnomenus* (Sacco *et al.*, 2019). Наконец, полисахариды, выделенные из культур молочнокислых бактерий, также могут оказывать влияние на формирование биоплёнок (Abid *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). Интересно, что такими свойствами обладают и полисахариды, входящие в состав ЛПС внешней мембраны грамотрицательных бактерий (Bandara *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2016; Sardar *et al.*, 2015). Помимо полисахаридов бактерий, способностью подавлять образование биоплёнок обладают некоторые полисахариды дрожжей (Vazquez-Rodriguez *et al.*, 2018) и диатомовых водорослей (Doghri *et al.*, 2017).

Таблица 2. Характеристики полисахаридов, для которых был показан эффект в отношении биоплёнок различных микроорганизмов.

Полисахарид	Ингибирование образования биоплёнок	Разрушение сформированных биоплёнок	Состав	Особенности	Ссылка
Капсульный полисахарид <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i>	Нет	Галактоза, глицерол-фосфат, ацетат	Препятствует адгезии бактерий к поверхностям и взаимодействию клеток друг с другом	(Travier <i>et al.</i> , 2013; Valle <i>et al.</i> , 2006)
Полисахариды матрикса биоплёнок <i>P. aeruginosa</i> Pel и Psl	Не исследовано	<i>S. epidermidis</i>	Глюкоза, манноза, рамноза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин	Psl также обладает бактерицидным действием в отношении стафилококков	(Liu <i>et al.</i> , 2022; Qin <i>et al.</i> , 2009)
Экзополисахарид <i>Lactobacillus acidophilus</i> A4	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Не исследовано		Показано изменение экспрессии некоторых генов при взаимодействии с полисахаридом	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
ЛПС различных грамотрицательных бактерий	Различные виды <i>Candida</i>	Не исследовано		В зависимости от комбинации ЛПС/вид <i>Candida</i> наблюдались ингибирование или стимуляция образования биоплёнок	(Bandara <i>et al.</i> , 2010)
Экзополисахарид <i>Vibrio</i> spp. QY101	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i> , но не <i>S. aureus</i>	Глюкуроновая кислота, галактуроновая кислота, рамноза, глюкозамин	Повышает эффективность антибиотиков против биоплёнок <i>P. aeruginosa</i>	(Jiang <i>et al.</i> , 2011)

Таблица 2. Продолжение.

Полисахарид	Ингибирование образования биоплёнок	Разрушение сформированных биоплёнок	Состав	Особенности	Ссылка
Экзополисахарид <i>S. phocae</i> PI80	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i>	Не исследовано	Арабиноза, фруктоза, галактоза	Показаны антиоксидантные свойства	(Kanmani <i>et al.</i> , 2011)
Полисахарид матрикса биоплёнок <i>E. coli</i> Ec300	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> , но не грамотрицательные бактерии	Не исследовано	Манноза, глюкоза, галактоза, глюкуроновая кислота	Подавляет адгезию <i>S. aureus</i> к поверхностям и защищает биоплёнки <i>E. coli</i> от <i>S. aureus</i>	(Rendueles <i>et al.</i> , 2011)
Экзополисахарид <i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i>	Не исследовано	Галактоза, глицерол-фосфат	Препятствует адгезии к поверхности	(Sayem <i>et al.</i> , 2011)
РАМ галактан <i>K. kingae</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. kingae</i> , <i>Candida albicans</i>	<i>S. aureus</i>	Галактоза	Препятствует адгезии к поверхности	(Bendaoud <i>et al.</i> , 2011)
Полисахарид <i>P. haloplanktis</i> TAC125	<i>S. epidermidis</i> , но не <i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>			(Papa <i>et al.</i> , 2013)
Экзополисахарид <i>Enterococcus faecium</i> MC13	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , слабо <i>S. typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Не исследовано	Глюкоза, галактоза	Показаны эмульгирующие и антиоксидантные свойства	(Kanmani <i>et al.</i> , 2013)

Таблица 2. Продолжение.

Полисахарид	Ингибирование образования биоплёнок	Разрушение сформированных биоплёнок	Состав	Особенности	Ссылка
Капсульный полисахарид <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Не исследовано		Препятствует адгезии бактерий к поверхностям и взаимодействию клеток друг с другом	(Karwacki <i>et al.</i> , 2013)
Экзополисахарид <i>Oceanobacillus iheyensis</i> ВК6	<i>S. aureus</i>	Не исследовано	Манноза, арабиноза, глюкоза,	Показаны эмульгирующие свойства	(Kavita <i>et al.</i> , 2014)
Экзополисахарид <i>Lactobacillus helveticus</i> MB2-1	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	Не исследовано	Манноза, галактоза, глюкоза,	Показаны эмульгирующие и антиоксидантные свойства	(Li <i>et al.</i> , 2014)
Капсульный полисахарид <i>K. pneumoniae</i>	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. aerogenes</i> , слабо <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	Не исследовано	Галактоза, глюкоза, рамноза, глюкуроновая кислота, галактозамин	Препятствует адгезии к поверхности	(Santos Goncalves Dos <i>et al.</i> , 2014)
Экзополисахарид <i>Arthrobacter</i> sp. B4	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. epidermidis</i>	Не исследовано			(Li <i>et al.</i> , 2015)
ЛПС <i>Marinobacter litoralis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Не исследовано	Фукоза, манноза, ксилоза,	Также показано ингибирование подвижности и продукции пиоцианина	(Sardar <i>et al.</i> , 2015)
Экзополисахарид <i>B. licheniformis</i> T14	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Не исследовано		Показаны эмульгирующие свойства	(Spanò <i>et al.</i> , 2016)

Таблица 2. Продолжение.

Полисахарид	Ингибирование образования биоплёнок	Разрушение сформированных биоплёнок	Состав	Особенности	Ссылка
Экзополисахарид <i>P. stutzeri</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Глюкозамин, рамноза, глюкоза, манноза	Подавляет вирулентность, снижает продукцию пиоцианина, экзопротеаз, рамнолипидов, ДНК, H ₂ O ₂	(Wu <i>et al.</i> , 2016)
Экзополисахариды PS I и PS II <i>P. ulvae</i> TC14	Различные морские бактерии	Не исследовано	Глюкоза	Вероятно, активностью в отношении биоплёнок обладает именно смесь полисахаридов	(Brian-Jaisson <i>et al.</i> , 2016)
Экзополисахарид <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Не исследовано		Препятствует адгезии бактерий к поверхностям и взаимодействию клеток друг с другом	(Pradeepa <i>et al.</i> , 2016)
Деацетилированный ЛПС <i>Vibrio vulnificus</i> и <i>E. Coli</i>	<i>V. vulnificus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>P. aeruginosa</i> , но не <i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Не оказывал эффекта			(Lee <i>et al.</i> , 2016)
Связанный с клетками полисахарид <i>Navicula phyllepta</i>	<i>Flavobacterium</i> sp.	Не исследовано		Образование биоплёнок <i>Roseobacter</i> sp. и <i>Shewanella</i> sp. стимулировалось	(Doghri <i>et al.</i> , 2017)

Таблица 2. Продолжение.

Полисахарид	Ингибирование образования биоплёнок	Разрушение сформированных биоплёнок	Состав	Особенности	Ссылка
Экзополисахарид <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UANL-001L	<i>S. aureus</i> , слабо <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	Не исследовано	Фукоза, галактоза, манноза, глюкоза	Также ингибирует планктонный рост	(Vazquez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2018)
Экзополисахариды 4-х видов молочнокислых бактерий	<i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i>	Глюкоза (декстраны), фруктоза (леван)		(Abid <i>et al.</i> , 2018)
Экзополисахариды двух видов <i>Pandoraea</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Не исследовано	Глюкоза, галактоза, манноза, глюкуроновая и галактуриновая кислоты, рамноза	Хотя полисахариды обоих видов <i>Pandoraea</i> схожи по своим свойствам, только один из них ингибирует образование биоплёнок	(Sacco <i>et al.</i> , 2019)
Экзополисахарид <i>Lactobacillus coryniformis</i> NA-3	<i>B. cereus</i> , <i>S. typhimurium</i>	<i>B. cereus</i> , <i>S. typhimurium</i>	Галактоза, глюкоза, рамноза, манноза	Показаны антиоксидантные свойства	(Xu <i>et al.</i> , 2020)
Экзополисахариды <i>L. plantarum</i> 12	<i>S. flexneri</i>	Не исследовано	Манноза, ксилоза, глюкоза, галактозамин, глюкуроновая кислота, галактоза	<i>L. plantarum</i> 12 продуцирует два полисахарида, однако только один подавляет образование биоплёнок, а также снижает МКЭБ некоторых антибиотиков	(Song <i>et al.</i> , 2020)

Таблица 2. Продолжение.

Полисахарид	Ингибирование образования биоплёнок	Разрушение сформированных биоплёнок	Состав	Особенности	Ссылка
Экзополисахарид <i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Ксилоза, галактоза, фукоза, глюкоза, арабиноза, фруктоза, неидентифицированные моносахариды	Ингибирует продукцию PNAG и экспрессию генов MSCRAMMS-белков; стимулирует действие антибиотиков против биоплёнок <i>S. aureus</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2021)

Полисахариды, обладающие антибиоплёнными свойствами, существенно различаются по своему составу и могут быть как гомополимерами (например, РАМ галактан *K. kingae* (Bendaoud *et al.*, 2011), глюканы PS I и PS II *P. ulvae* (Brian-Jaisson *et al.*, 2016), Pel-полисахарид *P. aeruginosa* (Qin *et al.*, 2009), декстраны и леван молочнокислых бактерий (Abid *et al.*, 2018)), так и гетерополимерами, в состав которых входят остатки маннозы, глюкозы, галактозы, глюкозамина, глюкуроновой и галактуроновой кислот и других сахаров (к ним относится большая часть перечисленных выше полисахаридов). Кроме того, в их состав могут входить не только сахара, но также глицеролфосфат (Sayem *et al.*, 2011; Valle *et al.*, 2006).

Также существенно различается специфичность полисахаридов, оказывающих влияние на бактериальные биоплёнки. Некоторые из них демонстрируют удивительно широкую специфичность и подавляют образование биоплёнок большого количества как грамположительных, так и грамотрицательных видов бактерий, в том числе *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* и других. К таким полисахаридам относятся капсульный полисахарид II группы *E. coli* (Valle *et al.*, 2006), секретлируемый полисахарид *L. acidophilus* (Kim *et al.*, 2009) и РАМ галактан *K. kingae* (Bendaoud *et al.*, 2011). Другие полисахариды, напротив, активны только в отношении биоплёнок группы видов, или даже одного вида бактерий. Так, полисахарид матрикса биоплёнок *E. coli* Ec300p подавлял образование биоплёнок некоторых грамположительных бактерий, но не оказывал влияния на биоплёнки грамотрицательных видов (Rendueles *et al.*, 2011). При этом полисахарид SN4B *P. haloplanktis* был активен в отношении биоплёнок *S. epidermidis*, но не его близкого родственника *S. aureus* (Papa *et al.*, 2013). Интересно, что некоторые бактериальные полисахариды подавляли формирование биоплёнок тех же видов бактерий, которые их продуцируют (Bendaoud *et al.*, 2011; Valle *et al.*, 2006), либо близкородственных видов (Sacco *et al.*, 2019), что указывает на возможность использования бактериями полисахаридов для регуляции структуры и/или динамики формирования и разрушения биоплёнок в естественных условиях. В других случаях, однако, собственные полисахариды матрикса, напротив, стимулировали образование биоплёнок (Song *et al.*, 2020).

Не все описанные полисахариды оказывают одинаковое влияние на биоплёнки. Некоторые из них способны как ингибировать образование биоплёнок, так и разрушать уже сформированные биоплёнки. Такие свойства показаны для РАМ галактана *K. kingae* (Bendaoud *et al.*, 2011), полисахаридов SN4В *P. haloplanktis* и EPS273 *P. stutzeri* (Wu *et al.*, 2016; Papa *et al.*, 2013) и экзополисахаридов *L. coryneformis* NA-3 (Xu *et al.*, 2020) и *D. radiodurans* (Chen *et al.*, 2021). Другие полисахариды, напротив, не оказывают никакого эффекта на сформированные биоплёнки, несмотря на выраженную способность подавлять их образование (Rendueles *et al.*, 2011; Santos Goncalves Dos *et al.*, 2014; Valle *et al.*, 2006). Интересно, что полисахарид *Vibrio* spp. A101 ингибировал формирование биоплёнок как *P. aeruginosa*, так и *S. aureus*, но при этом способствовал дисперсии зрелых биоплёнок только *P. aeruginosa*, но не *S. aureus* (Jiang *et al.*, 2011).

Механизм действия полисахаридов на бактериальные биоплёнки не ясен, и, вероятнее всего, различен для разных полисахаридов. Для большей части описанных полисахаридов было показано, что они препятствуют первоначальной адгезии бактериальных клеток к субстрату (Bendaoud *et al.*, 2011; Rendueles *et al.*, 2011; Santos Goncalves Dos *et al.*, 2014; Sayem *et al.*, 2011), при этом некоторые из них также ингибируют агрегацию бактерий (Jiang *et al.*, 2011; Karwacki *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2009; Valle *et al.*, 2006). Как правило авторы объясняют эти эффекты изменением физико-химических характеристик клеток и/или субстрата за счет взаимодействия с полисахаридом. В работе Travier *et al.*, 2013 (Travier *et al.*, 2013) было показано, что капсульный полисахарид группы II *E. coli* действительно изменяет поверхностные свойства клеток *E. coli*. Кроме того, авторы выделили несколько мутантов *E. coli*, частично устойчивых к действию полисахарида. Интересно, что свойства поверхности клеток всех полученных мутантов оказались скорректированы таким образом, чтобы компенсировать изменения, вызванные связыванием с полисахаридом. Однако нельзя исключить и другие механизмы действия. Для некоторых полисахаридов было показано, что они способны менять профиль экспрессии генов бактерий. Например, секретлируемый полисахарид *L. acidophilus* подавлял экспрессию генов, ответственных за хемотаксис и продукцию curli-белков матрикса биоплёнок *E. coli* (Kim *et al.*, 2009). Полисахарид EPS 273 *P. stutzeri* снижал

уровень продукции факторов вирулентности, H_2O_2 и секрецию внеклеточной ДНК *P. aeruginosa* (Wu *et al.*, 2016). Экзополисахарид, продуцируемый *D. radiodurans*, подавлял экспрессию *ica*-оперона и генов, кодирующих MSCRAMMS-белки *S. aureus*, а также ингибировал продукцию полисахарида матрикса биоплёнок PNAG (Chen *et al.*, 2021). Тем не менее, остается не ясным, являются ли эти изменения причиной или следствием подавления образования биоплёнок.

В случае применения полисахаридов в качестве средства для борьбы с биоплёнками патогенных бактерий, вероятнее всего их использование в качестве дополнения к стандартной антибиотикотерапии. Действительно, было показано, что полисахарид A101 *Vibrio* spp. снижал минимальную концентрацию аминогликозидных антибиотиков, необходимую для эрадикации биоплёнок *P. aeruginosa* FRD1, в 32 раза (Jiang *et al.*, 2011). Аналогичным образом, экзополисахарид *L. plantarum* 12 не только препятствовал формированию биоплёнок *S. flexneri*, но и снижал минимальную концентрацию эрадикации биоплёнок (МКЭБ) для левофлоксацина, ципрофлоксацина, цефазолина и в некоторой степени тетрациклина. Интересно, что МКЭБ аминогликозидов гентамицина и тобрамицина, а также аминопенициллинов ампициллина и амоксициллина при этом не изменялись (Song *et al.*, 2020). Также экзополисахарид *D. radiodurans* до некоторой степени повышал эффективность разных типов антибиотиков, а также активность мышинных макрофагов в отношении биоплёнок *S. aureus* (Chen *et al.*, 2021).

Вне зависимости от механизма действия полисахаридов, на поверхности бактериальных клеток или в составе синтезируемого ими матрикса должны присутствовать рецепторы, обуславливающие взаимодействие с полисахаридами. Очевидными кандидатами на роль молекулярных рецепторов полисахаридов являются различные лектины, по своей природе предназначенные для связывания сахаров. В случае *P. aeruginosa*, это могли бы быть лектины LecA и LecB или белок матрикса CdrA.

1.12 Антибактериальные лизины

Антибактериальные лизины (часто называемые просто лизинами) представляют собой белки, способные гидролизовать пептидогликан клеточной

стенки бактерий, что приводит к их осмотическому лизису. Поскольку механизм действия лизинов кардинально отличается от традиционных антибиотиков (разрушение клеточной стенки вместо ингибирования различных функций клетки), они одинаково эффективно действуют как на антибиотикочувствительные, так и на резистентные штаммы. Кроме того, от традиционных антибиотиков лизины отличаются высокой скоростью действия (Oliveira *et al.*, 2018; Pastagia *et al.*, 2013), а ферментативный механизм действия также обуславливает их активность в отношении биоплёнок (Chan & Abedon, 2015; Sharma *et al.*, 2018). Несколько антибактериальных лизинов в настоящий момент уже находятся на различных стадиях клинических исследований (Abdelkader *et al.*, 2019).

Механизм действия антибактериальных лизинов заключается в расщеплении пептидогликана клеточной стенки бактерий. Пептидогликан представляет собой полимерную сеть, состоящую из полисахаридных тяжей, перешитых друг с другом с помощью пептидных мостиков. Полисахаридная часть пептидогликана состоит из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. К пептидной части относятся стемовые или стволовые пептиды (“stem peptides”), состоящие из пяти аминокислотных остатков и ковалентно связанные с лактильной группой N-ацетилмурамовой кислоты, а также поперечные пептидные мостики (“peptide bridges” или “crosslinks”), соединяющие между собой стемовые пептиды соседних полисахаридных тяжей (рис. 6). Полисахаридная часть пептидогликана высоко консервативна и практически не отличается у бактерий разных видов. Наибольшей вариации подвержены пептидные мостики, которые могут отличаться как по последовательности, так и по длине, вплоть до полного их отсутствия и прямого соединения стемовых пептидов друг с другом. Также переменным остатком является третий остаток стемового пептида, обычно представленный аминокислотой лизином или диаминопимелиновой кислотой. У грамположительных бактерий толщина пептидогликановой оболочки может достигать нескольких десятков нанометров, в то время как у грамотрицательных бактерий слой пептидогликана намного тоньше, и заключен в периплазматическом пространстве между внутренней и внешней мембранами. Кроме того, у большинства грамположительных бактерий с пептидогликаном ковалентно связаны тейхоевые

кислоты и некоторые белки. Различные антибактериальные лизины могут гидролизовать различные связи в структуре пептидогликана: гликозидные (мурамидазы и глюкозаминидазы), пептидные (эндопептидазы) и амидные (амидазы) (рис. 6).

Как и большинство традиционных антибиотиков, антибактериальные лизины имеют природное происхождение и используются бактериями и бактериофагами. В бактериях подобные белки выполняют функции автолизинов и бактериоцинов. Автолизины отвечают за ремоделирование пептидогликана в процессе роста и деления бактериальной клетки (Alcorlo *et al.*, 2017). Бактериоцины используются бактериями для борьбы с конкурирующими видами. Грамположительные бактерии, как правило, секретируют подобные белки во внешнюю среду. Примерами таких белков могут служить лизостафин, зооцин А, миллерицин В, энтеролизин А (Beukes *et al.*, 2000; Kokai-Kun, 2012; Nilsen *et al.*, 2003; Simmonds *et al.*, 1995). Грамотрицательные бактерии используют систему секреции VI типа для доставки бактериоцинов в периплазму клетки-мишени (Coulthurst, 2019). Вирусы бактерий – бактериофаги – используют лизины для того, чтобы обеспечить как проникновение вирусной частицы внутрь бактериальной клетки (вирион-ассоциированные пептидогликан гидролазы), так и для высвобождения новых вирусных частиц из зараженной клетки (эндолизины) (Latka *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018). Наконец, такой важный фактор иммунной системы человека, как лизоцим, также является антибактериальным лизином-мурамидазой, расщепляющей полисахаридные цепочки пептидогликана бактериальной клеточной стенки (Ragland, Criss, 2017).

Как правило, антибактериальные лизины состоят из нескольких доменов, выполняющих разные функции. Каталитические домены, в англоязычной литературе часто называемые EAD (enzymatically active domain), отвечают за расщепление пептидогликана. Один лизин чаще всего имеет один или два каталитических домена. Помимо каталитического, большая часть лизинов также содержит домены, отвечающие за связывание с клеточной стенкой (связывающие домены, также называются CBD или CWBD, cell wall binding domain). Как каталитические домены, так и связывающие домены способны взаимодействовать с различными участками пептидогликана (полисахаридными цепочками, пептидами), а также с тейхоевыми

или липотейхоевыми кислотами. Количество связывающих доменов в одном лизине может варьировать от одного до порядка десяти, причём часто связывающие домены присутствуют в виде тандемных повторов – нескольких копий связывающего домена, относящихся к одному белковому семейству, идущих подряд (Binte Muhammad Jai *et al.*, 2020; Gerstmans *et al.*, 2018; São-José, 2018). Благодаря этому существует возможность конструировать химерные белки, комбинируя различные каталитические и таргетирующие домены. Такие лизины могут обладать как широкой, так и узкой специфичностью, что позволяет гибко подходить к решению конкретной проблемы.

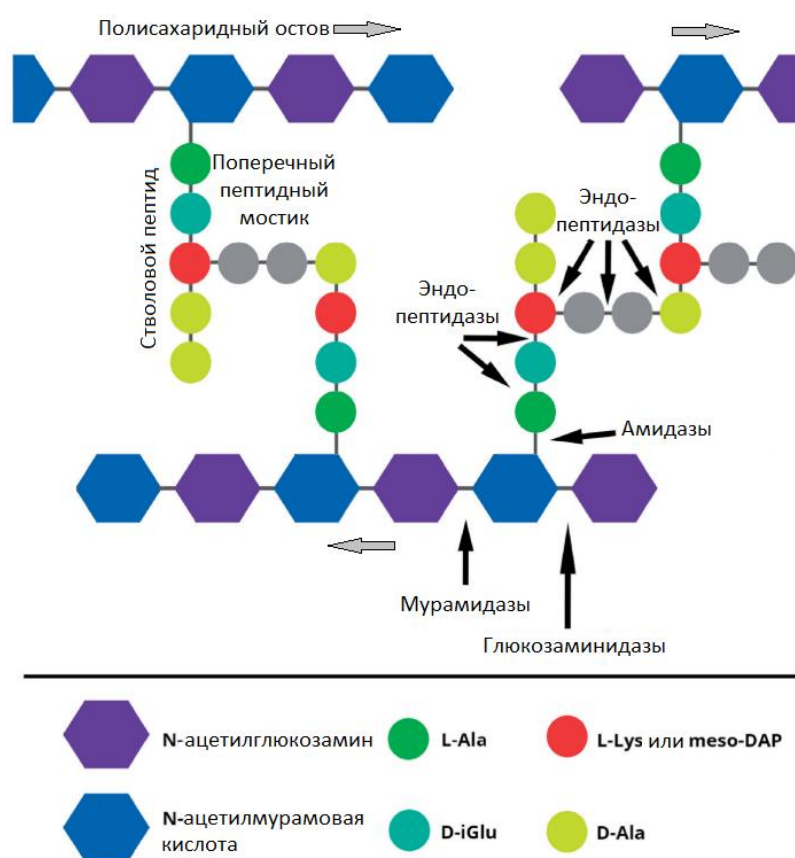


Рисунок 6. Схема химической структуры пептидогликана. Стрелочками отмечены места гидролиза пептидогликана различными типами антибактериальных лизинов. Рисунок цитирован по (Grishin *et al.*, 2020).

Множество работ посвящено изучению совместного действия антибактериальных лизинов и традиционных антибиотиков (Wittekind, Schuch, 2016). При этом синергический эффект проявляется не только при комбинировании лизинов

с антибиотиками, ингибирующими синтез клеточной стенки (пенициллины, ванкомицин), но и с полимиксином В, даптомицином, бацитрацином и др. Предположительно это может быть связано с тем, что расщепление пептидогликана лизинами способствует лучшему проникновению антибиотиков к своим мишеням. Отдельно стоит отметить, что некоторые комбинации лизин/антибиотик не только обладают синергическим эффектом, но и препятствуют развитию устойчивости к каждому из антимикробных агентов (например, лизостафин/ β -лактамы антибиотики, CF-301/ванкомицин, CF-301/даптомицин). Был показан синергический эффект лизостафина и антимикробных пептидов, а также антибиотиков, действующих на бактериальную мембрану, в том числе низина, даптомицина и полимиксина В (Desbois, Coote, 2011).

Многие лизины были протестированы не только в стандартных тестах против планктонных клеток, но и против бактериальных биоплёнок. Хотя результаты этих работ трудно сравнивать между собой, поскольку для оценки эффективности действия лизинов на биоплёнки были использованы различные методы, как правило, концентрация лизина, необходимого для уничтожения биоплёнки, превышает таковую концентрацию для планктонных клеток. Например, в работе Wu и соавт. 2003 минимальная ингибирующая концентрация (МИК) лизостафина против *S. aureus* составляла 0.002–0.008 мкг/мл в зависимости от штамма, в то время как для уничтожения биоплёнки было необходимо 12.5 мкг/мл (Wu *et al.*, 2003). В другой работе МИК лизостафина оказалась равной 0.0625–0.5 мкг/мл в зависимости от штамма, но для уничтожения биоплёнок было необходимо 4–32 мкг/мл лизостафина, при этом биоплёнки 5 из 12 протестированных штаммов оказались устойчивы даже к 64 мкг/мл лизостафина (Walenska *et al.*, 2005). Аналогичным образом МИК лизина PlyC для *Streptococcus pyogenes* оказалась равной 0.02–0.04 мкг/мл, в то время как концентрация, необходимая для уничтожения биоплёнок, превышала 1 мкг/мл (Shen *et al.*, 2013). Причины таких отличий в активных концентрациях против планктонных клеток и биоплёнок не вполне ясны, но скорее всего заключаются в высокой плотности бактериальных клеток внутри биоплёнок и наличии матрикса, затрудняющего диффузию лизинов. Как и в случае с планктонными клетками, комбинация лизинов и традиционных антибиотиков показывает хорошие результаты

в отношении биоплёнок. Так, эффективность против бактериальных биоплёнок была показана для лизостафина и оксациллина, ванкомицина и линезолида (Walencka *et al.*, 2006), лизостафина и низина (Ceotto-Vigoder *et al.*, 2016), лизина MR-10 и миноциклина при последовательном применении против биоплёнок *S. aureus* (Chopra *et al.*, 2015).

Одним из наиболее изученных и наиболее эффективных антибактериальных лизинов, описанных на сегодняшний день, является лизостафин. Лизостафин представляет собой глицил-глициновую эндопептидазу, которая расщепляет поперечные пептидные мостики в пептидогликане *S. aureus*, состоящие из пяти остатков глицина (Kokai-Kun, 2012). В природе лизостафин продуцируется *Staphylococcus simulans* для конкурентной борьбы с *S. aureus* и синтезируется в виде пре-профермента. Зрелый лизостафин представляет собой небольшой белок и состоит из двух доменов (рис. 7). N-концевой домен относится к семейству цинк-зависимых пептидаз M23 и специфичен в отношении пентаглициновых поперечных мостиков *S. aureus* (Bardelang *et al.*, 2009; Browder *et al.*, 1965; Sabala *et al.*, 2014). Связывающий домен лизостафина относится к семейству SH3b и взаимодействует как с поперечными мостиками, так и со стемовыми пептидами пептидогликана *S. aureus* (Gonzalez-Delgado *et al.*, 2020; Mitkowski *et al.*, 2019; Tossavainen *et al.*, 2018).

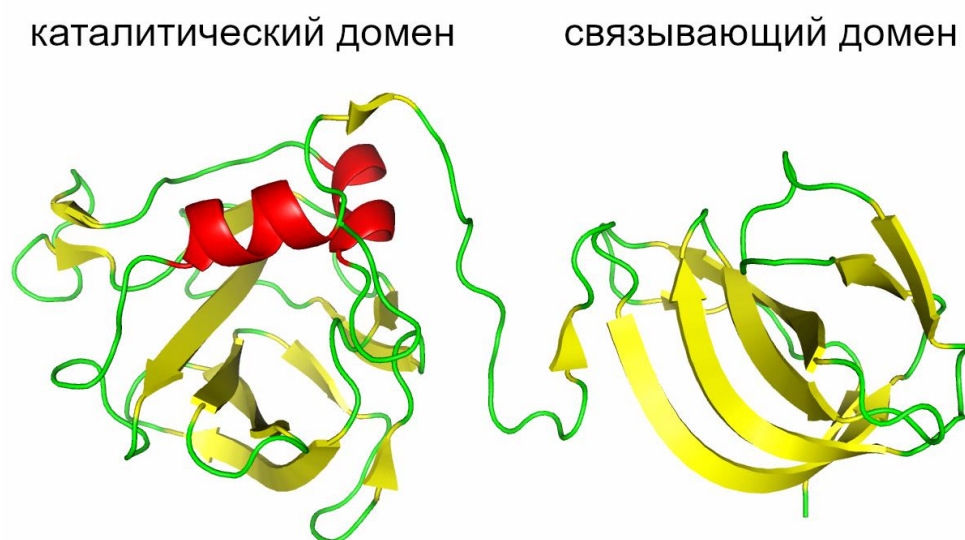


Рисунок 7. Трёхмерная структура лизостафина.

МИК лизостафина для некоторых штаммов *S. aureus* может достигать крайне низких значений в несколько нанограмм на миллилитр, при этом 90% штаммов чувствительны к 30 нг/мл лизостафина (Kusuma, Kokai-Kun, 2005). Лизостафин одинаково действует как на метициллин-чувствительные, так и на метициллин-резистентные штаммы *S. aureus*. Эффективность лизостафина была продемонстрирована в моделях системной стафилококковой инфекции мышей и крыс (Kokai-Kun *et al.*, 2007; Oluola *et al.*, 2007; Placencia *et al.*, 2009), при образовании биоплёнок на катетерах (Kokai-Kun *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2004), стафилококковой пневмонии (Chen *et al.*, 2014), кератите и эндофтальмите (Dajcs *et al.*, 2000, 2001), для эрадикации *S. aureus* при его колонизации носоглотки (Kokai-Kun *et al.*, 2003), а также в моделях стафилококкового остеомиелита (Johnson *et al.*, 2018; Keller *et al.*, 2023; Windolf *et al.*, 2014). Все это делает лизостафин перспективным средством для борьбы с золотистым стафилококком и его биоплёнками.

1.13 Ферменты, разрушающие матрикс биоплёнок

Один из наиболее эффективных способов нарушения целостности матрикса бактериальных биоплёнок заключается в использовании гидролитических ферментов (Nahar *et al.*, 2018; Thorn *et al.*, 2021). Поскольку основными компонентами матрикса биоплёнок являются различные полимерные молекулы, такие как полисахариды и ДНК, гидролиз этих молекул до их мономерных составляющих или коротких олигомеров эффективно нарушает связность матрикса и общую структуру биоплёнок, обеспечивая высвобождение бактериальных клеток и их переход в планктонную форму.

Среди таких ферментов одним из первых был описан дисперсин В (далее просто дисперсин), продуцируемый *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Дисперсин разрушает поли-N-ацетил-глюкозамин, входящий в состав матрикса биоплёнок многих бактериальных патогенов. Было показано, что дисперсин В способен частично или полностью удалять биоплёнки *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Yersinia pestis* и *P. fluorescens* (Itoh *et al.*, 2005) (Рисунок 8). Впоследствии способность разрушать бактериальные биоплёнки была продемонстрирована и для

других полисахарид-гидролаз (Nahar *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018). В отношении биоплёнок *P. aeruginosa* активны ферменты PelA_h и PslG_h, гидролизующие полисахариды Pel и Psl соответственно (Baker *et al.*, 2016), но также и многие другие неспецифические ферменты, такие как α -амилаза и целлюлаза (Redman *et al.*, 2020), леваназа SacC *Bacillus subtilis* (Trizna *et al.*, 2019), β -маннозидаза (Banar *et al.*, 2016), β -(1-3)-глюкозидаза (литиказа) (Banar *et al.*, 2019), ксиланаза (Lee *et al.*, 2018; Redman *et al.*, 2021) и N-ацетил- β -D-гексозаминидаза DisH (Zhu *et al.*, 2018). В биоплёнках мукоидных штаммов *P. aeruginosa* присутствует альгинат, и такие биоплёнки чувствительны к различным альгинат лиазам (Daboog *et al.*, 2019; Nahar *et al.*, 2018). Неспецифические протеазы, такие как протеиназа К, трипсин, субтилизин, папаин и бромелаин, пептидаза *Serratia marcescens* и коммерческие протеолитические препараты тоже способны эффективно разрушать биоплёнки широкого спектра бактериальных патогенов, в том числе и *P. aeruginosa* (Mohamed *et al.*, 2018; Nahar *et al.*, 2018). Наконец, внеклеточная ДНК может быть разрушена с помощью различных нуклеаз, таких как ДНКаза I или микрококковая нуклеаза (Kiedrowski *et al.*, 2011; Nahar *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2011).



Рисунок 8. Трёхмерная структура дисперсина.

Важным свойством всех этих ферментов является то, что они показывают синергический эффект при совместном применении друг с другом, а также с другими химическими (дезинфектанты, антибиотики, поверхностно-активные вещества) и физическими (ультразвуковая обработка) методами удаления бактериальных биоплёнок (Meireles *et al.*, 2016; Nahar *et al.*, 2018). Синергический эффект наблюдается в том числе и при комбинировании ферментов, разрушающих матрикс биоплёнок, с описанными выше антибактериальными лизинами. В частности, фермент-амидаза, расщепляющий пептидогликан *Listeria monocytogenes*, и неспецифическая протеиназа К по-отдельности были мало эффективны в отношении биоплёнок *L. monocytogenes*, культивируемых в 96-луночных планшетах, в то время как их комбинация позволила полностью удалить биоплёнки (Simmons *et al.*, 2012). Эндолизин бактериофага LysK и фермент DA7, гомологичный дисперсину и гидролизующий полисахарид PNAG, показывали способность элиминировать биоплёнки *S. aureus* как по-отдельности, так и при совместном применении, причём в последнем случае они демонстрировали выраженное синергическое действие (Olsen *et al.*, 2018). Тот же фермент DA7 показывал синергическое действие и с двумя другими антистафилококковыми лизинами в отношении биоплёнок *S. aureus in vitro* (Sumrall *et al.*, 2021). Таким образом, использование ферментативных способов борьбы с биоплёнками, в том числе комбинаций ферментов с разным типом активности и разными мишенями (матрикс биоплёнок, пептидогликан клеточной стенки), представляется перспективным направлением исследований.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Штаммы и реактивы

В данной работе использовались лабораторный штамм *P. aeruginosa* PAO1 и клинический изолят 216. Клинический изолят 216 был выделен от больного муковисцидозом сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (заведующий лабораторией проф. И. А. Шагинян). Для данной работы оба штамма были предоставлены И. Г. Тигановой. Культуры поддерживали на агаризованной среде Difco nutrient broth (Becton Dickinson, США) с добавлением 1.5% агара. Для длительного хранения клетки замораживались при -80°C в 40% растворе глицерина.

Для наработки рекомбинантного белка LecA использовался штамм *E. coli* M15 [pRep4] (Qiagen, Германия).

Олигосахариды галактозил-маннотриоза, дигалактозил-маннопентаоза и вербаскоза были приобретены в Megazyme Inc. (Брей, Ирландия). Все олигосахариды растворялись в стерильной воде в концентрации 100 мМ и хранились при 4°C .

Полисахариды глюкан ячменя, галактан картофеля, пектиновый галактан картофеля, галактоманнан гуара, глюкоманнан *Amorphophallus konjac*, рамногалактоуронан картофеля и арабиногалактан лиственницы были приобретены в Megazyme Inc. (Брей, Ирландия), ламинарин *Laminaria digitata* – в Sigma (Сент-Луис, США). Для опытов по ингибированию гемагглютинации и первого скринингового опыта по ингибированию образования биоплёнок полисахариды были растворены в воде в концентрации 10 мг/мл и автоклавированы. Для последующих экспериментов галактан картофеля, пектиновый галактан картофеля и глюкан ячменя были растворены в стерильной воде в концентрации 10 мг/мл согласно инструкции производителя. К порошкам галактана и пектинового галактана добавлялась часть стерильной воды, смесь нагревалась до 60°C и перемешивалась на магнитной мешалке до полного растворения полисахарида. К порошку глюкана добавлялась часть стерильной

воды, смесь доводилась до кипения при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке, после чего нагрев отключался и смесь перемешивалась до полного растворения полисахарида. Растворы полисахаридов доводились стерильной водой до финального объёма, после чего центрифугировались в течение 10 минут при 12000 g для осаждения не растворившихся примесей и нагревались до 80°C в течение двух часов для стерилизации. Стерильность полученных растворов подтверждали посевом на агаризованные среды Difco nutrient agar и VNI agar (Sifin Diagnostics, Берлин, Германия), а также в жидкую тиогликолевую среду (HiMedia Laboratories, Мумбаи, Индия).

Антибиотики цефтазидим и амикацин (ОАО Синтез, Курган, Россия) растворялись в среде M63 в концентрации 100 мг/мл перед каждым экспериментом. Ципрофлоксацин (Elfa Laboratories, New Delhi, India) хранился в виде стокового раствора 2 мг/мл и разводился до финальных концентраций перед каждым экспериментом.

2.2 Клонирование, наработка и выделение рекомбинантного LecA

В качестве последовательности белка LecA была выбрана аминокислотная последовательность Q05097 (PA1L_PSEAE) из банка данных UniProt (www.uniprot.org). Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность LecA, дополнительно фланкированную аминокислотами MGS на N-конце и RS на C-конце, была спланирована с учетом частот кодонов, характерных для *E. coli*, и минимизации вторичной структуры. Оптимизация кодонного состава проводилась с помощью интернет-сервиса JCat (<http://www.jcat.de>, референсный организм *E. coli* K12), предсказание вторичной структуры проводилось с помощью интернет-сервиса UNAFold (<http://www.unafold.org>). Спланированная нуклеотидная последовательность была синтезирована ООО Евроген (Москва, Россия).

Полученная нуклеотидная последовательность была клонирована в плазмиду pQE13. Для этого фрагмент ДНК, кодирующий белок LecA, а также плазида pQE13, были гидролизованы рестриктазами BamHI и BglII (СибЭнзим, Новосибирск, Россия) в буфере FastDigest (ThermoFischer Scientific, США) в течение 60 минут при 37°C. Полученные фрагменты были разделены в 1% агарозном геле. Требуемые фрагменты

ДНК выделялись из фрагментов агарозного геля с помощью центрифугирования в пробирках с фильтрующей вставкой SpinX 0.22 мкм (Corning, США) и лигировались лигазой T4 DNA Ligase (ThermoFischer Scientific, США) в буфере Quick ligation (Евроген, Россия) в течение 30 минут при комнатной температуре. ДНК осаждали с помощью добавления этанола, инкубирования в течение 15 минут при -80°C и центрифугирования при 20000 g в течение 10 минут. Осадок растворяли в дистиллированной воде при 65°C и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* M15 [pRep4] методом электропорации.

Для приготовления компетентных клеток ночную культуру *E. coli* M15 [pRep4] с чашки Петри с агаризованной средой LB суспендировали в жидкой среде LB с добавлением 25 мкг/мл канамицина до оптической плотности, равной 1.5 при $\lambda=550$ нм. Полученную суспензию разбавляли в 100 раз средой LB с добавлением 25 мкг/мл канамицина и инкубировали при 37°C и 180 об./мин. до достижения культурой оптической плотности 0.4-0.5. Клетки осаждали центрифугированием при 4°C и ресуспендировали в охлажденной дистиллированной воде. Отмывку повторяли с ресуспендированием в охлажденной дистиллированной воде (0.4 от исходного объема), и дважды – в охлажденном 10% глицерине (1/50 и 1/100 от исходного объема).

Трансформация клеток проводилась с помощью электропоратора MicroPulser (Bio-rad, США) в режиме Ec2. К лигазной смеси добавляли 1/10 объема компетентных клеток и переносили в кювету для трансформации. После трансформации к суспензии добавляли 1 мл среды LB и инкубировали в течение 50 минут при 37°C и 60 об./мин. Затем клетки высевались на чашки Петри с агаризованной средой LB с добавлением 25 мкг/мл канамицина и 150 мкг/мл ампициллина и инкубировались при 37°C в течение ночи.

Контроль наличия целевого гена в трансформантах проводился с помощью рестрикционного анализа.

Штамм-продуцент *E. coli* M15 [pRep4, pLecA] засеивали в пробирки с 5 мл среды LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl), содержащей 25 мкг/мл канамицина и 150 мкг/мл ампициллина, и инкубировали на качалке в течение

ночи при 37°C и 70 об./мин. Ночную культуру штамма-продуцента (1%) засеивали в колбы, содержащие 200 мл среды LB с добавлением 25 мкг/мл канамицина и 150 мкг/мл ампициллина, и культивировали на качалке при 37°C и 180 об./мин до достижения культурой оптической плотности 1.0-1.5 при 600 нм. Синтез рекомбинантного белка индуцировали добавлением ИПТГ до концентрации 0.5 мМ, после чего продолжали инкубирование в тех же условиях в течение 3 часов. Биомассу собирали центрифугированием на центрифуге 4К15 Sigma (США) при 6000 g в течение 15 мин. Полученную биомассу использовали далее для выделения рекомбинантного ЛесА.

Биомассу штамма-продуцента ресуспендировали в 10-кратном объеме лизирующего буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 50 мМ NaCl), добавляли лизоцим до концентрации 100 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Лизат обрабатывали ультразвуком на льду в течение 2 мин в импульсном режиме с интервалами 5 с, импульсами мощностью 30% от максимальной на установке Bandelin Sonopuls (Bandelin Electronics, Германия). Тельца включения отделяли от лизата центрифугированием при 10000 g в течение 20 минут и промывали буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1% тритон X-100, 0.5 М NaCl и 1 М мочевины. Затем тельца включения растворяли в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5 и 8 М мочевины и центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут. Супернатант разбавляли буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5 и 40 мМ имидазола, до концентрации мочевины 2 М. Разбавленный супернатант инкубировали с хроматографическим сорбентом Workbeads Ni Bio-Works 40 в течение 30 минут, после чего сорбент промывали десятикратным объемом буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 40 мМ имидазола и 0.5 М NaCl. Рекомбинантный белок ЛесА элюировали 1 М раствором имидазола и диализовали против 50 мМ Tris-HCl буфера, pH 7.5.

2.3 Гемагглютинация

Для реакции гемагглютинации использовали человеческие эритроциты группы крови В. Эритроциты готовили по методу, описанному в (Kadam *et al.*, 2011) с модификациями: 7-9 капель крови из пальца суспендировали в 8-10 мл PBS,

отмывали 3 раза, осаждая центрифугированием (5 мин, 1200 об./мин), затем суспендировали в том же буфере до концентрации 4-5% (v/v). К суспензии эритроцитов добавляли 1/10 часть раствора папаина (10 мг/мл; Merck KGaA, Дармштадт, Германия) в растворе солянокислого цистеина (1 мг/мл) и выдерживали 30 мин при 37°C и непрерывном помешивании. После этого эритроциты отмывали 3 раза PBS и суспендировали в том же буфере. Полученные эритроциты хранились при +4°C не более 4-5 дней. После хранения эритроциты отмывали 3 раза PBS от следов гемолиза. Для реакции гемагглютинации использовали 2.5-4% (v/v) суспензию эритроцитов.

Реакцию гемагглютинации проводили в течение 2 ч при 37°C в 96-луночных планшетах с круглым дном. Объем суспензии эритроцитов в лунке составлял 25 мкл, остальные компоненты (ЛесА, олиго- и полисахариды) добавлялись до конечного объема 50 мкл. Минимальная концентрация рекомбинантного ЛесА, вызывающая агглютинацию эритроцитов, зависела от партии белка и определялась для каждой партии отдельно. Разведения ЛесА готовили в PBS с добавлением 1 mM CaCl₂. В реакции гемагглютинации полисахариды были использованы в конечной концентрации 2.5 мг/мл. В качестве положительного контроля для ингибирования активности ЛесА использовали ИПТГ (SERVA Electrophoresis GmbH, Гейдельберг, Германия). Двукратные серийные разведения конканавалина А (исходная концентрация 10 мкг/мл; ООО «ПанЭко», Москва, Россия) использовались в качестве контроля реакции гемагглютинации на каждом планшете.

2.4 Изотермальная титрационная калориметрия (ИТС)

Эксперименты проводились на приборе iTC200 (GE Healthcare, США). Все эксперименты проводились при температуре +30°C и перемешивании со скоростью 300 об./мин. При анализе результатов первая инъекция (0.4 мкл) не учитывалась.

Для изучения взаимодействия ЛесА и растительных олигосахаридов в ячейку добавляли ЛесА в концентрации 278 мкМ в 50 mM Tris-HCl буфере, pH 8.0, с добавлением CaCl₂ (200 мкМ), в шприц добавляли лиганд (ИПТГ, 2.1 mM; вербаскоза, 3 mM; галактоманнотриоза, 4 mM или дигалактоманнопентаоза, 1 mM) в том же буфере с той же концентрацией CaCl₂. При анализе результатов из общей энергии

вычиталась энергия разведения лиганда. Для определения энергии разведения лиганда были использованы аналогичные условия, но в ячейке был дополнительно добавлен избыток лиганда (ИПТГ, 2.1 мМ; вербаскоза, 4 мМ; галактоманнотриоза, 2 мМ или дигалактоманнопентаоза, 1 мМ). Полученные термограммы обрабатывались в программе Origin с помощью функций, поставляемых производителем прибора (GE Healthcare, США).

Для инкубации с олигосахаридами использовался LecA в концентрации 8 мг/мл (556 мкМ), олигосахариды в концентрации 5 мМ, CaCl₂ в концентрации 0.5 мМ. Инкубация проводилась в течение суток при +4 °С.

2.5 Культивирование, ингибирование и разрушение биоплёнок *P. aeruginosa* в 96-луночных планшетах

Для скринингового теста на определение способности различных полисахаридов ингибировать образование биоплёнок *P. aeruginosa* была использована следующая методика. Полисахариды, растворенные в воде в концентрации 10 мг/мл и стерилизованные автоклавированием, разводились с помощью двукратных разведений в среде LB до концентраций 5, 2.5 и 1.25 мг/мл. К каждому разведению образца добавляли свежую стационарную культуру изолята 216 в среде LB в количестве 10 мкл на 600 мкл, после чего по 100 мкл каждого разведения вносили в лунки плоскодонного 96-луночного планшета. Планшет инкубировали в течение 5 ч во влажной камере при 37°С без качания. После инкубации культуральную жидкость отбирали и добавляли раствор кристаллического фиолетового. После окрашивания лунки трижды промывали дистиллированной водой и вносили 96%-ный этанол для экстракции красителя. Через 1 ч измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра iEMS Reader MF (ThermoFischer Scientific, Уолтем, США).

Для дальнейших экспериментов по исследованию ингибирующего действия галактана на биоплёнки *P. aeruginosa* была использована следующая методика. Культивация биоплёнок осуществлялась в среде M63 (3 г/л КН₂РО₄, 7 г/л К₂НРО₄, 2 г/л (NH₄)₂SO₄) с добавлением 1 мМ MgSO₄, 0.2% глюкозы и 0.5% казаминовых кислот. Ночные культуры штаммов *P. aeruginosa* на агаризованной питательной среде

Difco nutrient agar суспендировались в среде М63 до мутности, соответствующей стандарту 0.5 McFarland ($\sim 1.0-1.5 \times 10^8$ КОЕ/мл) и разводились до финальной концентрации $\sim 3-5 \times 10^7$ КОЕ/мл. Полученные бактериальные суспензии вносились в лунки 96-луночного планшета (Costar 3599 tissue culture treated flat bottom plates, Corning, Нью-Йорк, США) в объёме 90 мкл на лунку. Далее к бактериальной суспензии добавлялось по 10 мкл раствора галактана, глюкозана или стерильной воды в качестве контроля. Планшет запечатывали парафильмом и инкубировали при 36°C в течение 24 часов без качания. После инкубации биоплёнки отмывались следующим образом. 100 мкл базовой среды М63 (без добавления питательных веществ) вносились в лунки планшета, содержимое лунок несколько раз пипетировалось, затем отбиралось с помощью пипетки чтобы не допустить прилипания суспендированных агрегатов к стенкам лунок планшета. Далее в лунки вносилось по 200 мкл базовой среды М63, после чего содержимое планшета встряхивалось в контейнер для сброса. Эта операция выполнялась трижды. После промывки остатки жидкости удалялись за счет отстукивания планшета на бумажной салфетке и планшет оставлялся сушиться вверх дном до следующего дня. Для окрашивания биоплёнок на следующий день в лунки планшета добавлялись по 200 мкл 0.1% раствора кристаллического фиолетового, планшет инкубировался при комнатной температуре в течение 20-30 минут, после чего краситель отмывался в проточной воде и планшет оставлялся сушиться вверх дном. Для солубилизации красителя после высушивания в лунки планшета добавлялось по 100 мкл 30% уксусной кислоты, планшет инкубировался при комнатной температуре в течение 20-30 минут, после чего содержимое лунок перемешивалось пипетированием и 90 мкл переносилось в другой плоскодонный планшет. Оптическая плотность солубилизованного красителя измерялась при длине волны 550 нм в планшетном ридере Multiscan FC (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Для определения влияния галактана на сформированные биоплёнки *P. aeruginosa*, биоплёнки культивировались в 96-луночных планшетах в среде М63 в течение 24-х часов и отмывались от планктонных клеток и среды как описано выше. После этого в лунки планшета вносилось по 90 мкл свежей среды М63 с добавлением $MgSO_4$, глюкозы и казаминовых кислот, а также по 10 мкл раствора галактана,

глюкана или стерильной воды в качестве контроля. Лунки с контрольной 24-х часовой биоплёнкой оставались пустыми. Планшет запечатывали парафильмом и инкубировали в течение 24-х часов при 36°C без качания. После инкубации планшет отмывался, биоплёнка окрашивалась кристаллическим фиолетовым и количество краски определялось после её солубилизации 30% уксусной кислотой с помощью измерения оптической плотности при длине волны 550 нм.

Эксперименты по ингибированию образования биоплёнок *P. aeruginosa* моносахаридами проводились аналогично экспериментам с галактаном. Моносахариды галактоза и глюкоза использовались в концентрациях, эквивалентных концентрациям галактана и глюкана (1 мг/мл). Олигосахарид дигалактозил-маннопентаоза использовался в концентрации 2 мг/мл (~1.7 мМ). Эта концентрация была максимальной концентрацией, рассчитанной исходя из доступного количества олигосахарида.

На рисунках данные, полученные в опытах с окраской биоплёнок кристаллическим фиолетовым, представлены в виде диаграмм типа ящик с усами, где границы ящика обозначают 25% и 75% процентиля, линия в середине – медианное значение, усы – минимальное и максимальное значения.

2.6 Культивирование, ингибирование и разрушение биоплёнок *P. aeruginosa* на полипропиленовых купонах

Полипропиленовые купоны размером ~10.0×6.5 мм вырезались из листа полипропилена толщиной 0.5 мм (Trans G03, Carolex, Лонге-Жумель, Франция). Для того, чтобы различать стороны купона, один из углов купона обрезался. Купоны были стерилизованы вымачиванием в 70% этаноле. Перед применением купоны высушивались на воздухе в стерильных условиях. Аналогично эксперименту с ингибированием образования биоплёнок в 96-луночных планшетах, в лунки 96-луночного планшета вносилось по 90 мкл суспензии бактерий (~3-5×10⁷ КОЕ/мл) и 10 мкл раствора галактана или стерильной воды в качестве контроля. После этого в лунки планшета с помощью пинцета помещались полипропиленовые купоны в вертикальном положении. Планшет запечатывался парафильмом и инкубировался в течение 24 часов при 36°C без качания. После инкубации купоны извлекались из

среды, промывались 2 мл базовой среды М63 и оставлялись сушиться при комнатной температуре. Для окрашивания биоплёнки купоны помещались в лунки 96-луночного планшета, содержащие 200 мкл 0.1% кристаллического фиолетового и инкубировались при комнатной температуре в течение 20-30 минут. После окрашивания купоны промывались в емкости с водой и высушивались. Окрашенная биоплёнка стиралась с одной из сторон купона ватной палочкой, смоченной 70% этанолом. Для этого выбиралась сторона, обращённая вниз при высушивании. После этого купоны фотографировались и изучались с помощью микроскопии.

Для экспериментов с воздействием галактана на сформированные биоплёнки полипропиленовые купоны с 24-х часовой биоплёнкой промывались 2 мл базовой среды М63 и помещались в лунки 96-луночного планшета, содержащие 90 мкл полной среды М63 с добавлением 10 мкл галактана или стерильной воды в качестве контроля. Планшет запечатывался парафильмом и инкубировался в течение 24-х часов при 36°C без качания. После этого полипропиленовые купоны отмывались и окрашивались как описано выше.

2.7 Определение влияния полисахаридов на планктонный рост *P. aeruginosa*

Ночные культуры штаммов *P. aeruginosa* на агаризованной питательной среде Difco nutrient agar суспендировались в среде М63 до мутности, соответствующей стандарту 0.5 McFarland, после чего разводились до финальной концентрации $\sim 5 \times 10^6$ КОЕ/мл. Бактериальные суспензии вносились в лунки 96-луночного планшета (Costar 3599 tissue culture treated flat bottom plates, Corning, Нью-Йорк, США) в объёме 90 мкл на лунку. К бактериальной суспензии добавлялось по 10 мкл раствора галактана, глюкозы или стерильной воды в качестве контроля (финальная концентрация полисахаридов 1 мг/мл), и планшет инкубировался при 36°C и 400 об./мин. Через 0, 4, 6 и 8 часов оптическая плотность суспензии бактерий при 620 нм измерялась на планшетном ридере Multiscan FC, после чего содержимое части лунок переносилось в микроцентрифужные пробирки, пробирки кратко вортиксовались, и из суспензии бактерий готовились серийные десятикратные разведения в базовой среде М63 (РАО1) или PBS (изолят 216), после чего по 10 мкл из каждого разведения наносилось

на чашки Петри с агаризованной питательной средой Difco nutrient broth с добавлением 1.5% агара и 1.0% NaCl. Чашки инкубировались при 36°C. На следующий день подсчитывалось количество выросших колоний в разведении с максимальным количеством колоний, поддающимся подсчету. Каждая серия разведений наносилась на чашки дважды, в качестве результата для конкретного образца бралось среднее значение между двумя нанесениями.

2.8 Определение МИК и МБК

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК) проводилось той же среде, что и культивация биоплёнок: М63 с добавлением 1 мМ MgSO₄, 0.2% глюкозы и 0.5% казаминовых кислот. Ночные культуры штаммов *P. aeruginosa* на агаризованной питательной среде Difco nutrient agar суспендировались в среде М63 до мутности, соответствующей стандарту 0.5 McFarland ($\sim 1.0-1.5 \times 10^8$ КОЕ/мл) и разводились до финальной концентрации $\sim 5 \times 10^5$ или $\sim 3-5 \times 10^7$ КОЕ/мл в зависимости от опыта. Полученные бактериальные суспензии вносились в лунки 96-луночного планшета в объёме 90 мкл на лунку. Далее к бактериальной суспензии добавлялось по 10 мкл серийных двукратных разведений антибиотиков, приготовленных в той же среде. Планшет запечатывался парафильмом и инкубировался в течение 24-х часов при 36°C без качания. МИК определялась как минимальная концентрация антибиотика, при которой через 24 часа инкубации во всех трёх повторностях не наблюдается видимой невооружённым глазом мутности. После определения МИК по 3 мкл содержимого лунок переносилось на чашки Петри с агаризованной питательной средой. Чашки инкубировались при 36°C. МБК определялась как минимальная концентрация антибиотика, при которой во всех трёх повторностях не наблюдалось бактериального роста на следующий день после переноса содержимого лунок планшета на агаризованную среду.

Данная методика определения МБК используется для сравнения устойчивости бактерий к антибиотикам в планктонной и биоплёночной формах (Mah, 2014). Однако, необходимо отметить, что эта методика несколько отличается от стандартной. Стандартная методика определяет МБК как концентрацию антибиотика,

убивающую 99.9% бактерий и подразумевает подсчет КОЕ в суспензии бактерий после применения антибиотика. Таким образом, стандартная методика является существенно более трудоемкой. Тем не менее при исходной концентрации бактерий равной 5×10^5 и с учетом того, что чувствительность использованной в данной работе методике равна $\sim 10^3$ КОЕ/мл, отсутствие бактериального роста на агаризованной среде примерно соответствует снижению количества жизнеспособных бактерий на 3 порядка (то есть гибели 99.9% бактерий). При исходной концентрации бактерий равной $\sim 3-5 \times 10^7$ КОЕ/мл, однако, эта методика представляет более строгий критерий для МБК по сравнению со стандартной.

Для того, чтобы определить концентрацию антибиотика, которая приводит к гибели всех бактерий в планктонной форме, суспензия бактерий с концентрацией $\sim 5 \times 10^7$ КОЕ/мл инкубировалась с антибиотиками в концентрациях, равных МБК, 2*МБК и 4*МБК в лунках 96-луночного планшета в течение 24-х часов при 36°C без качания. После инкубации по 50 мкл суспензии бактерий переносились на чашки Петри с агаризованной питательной средой и растирались шпателем. Количество колоний подсчитывалось после инкубации чашек в течение суток при 36°C. Эксперимент был сделан дважды в трёх повторностях.

2.9 Определение МКЭБ

Минимальные концентрации антибиотиков, необходимые для эрадикации биоплёнок (МКЭБ) определялись в двух экспериментальных системах: в 96-луночных планшетах и на Calgary Biofilm Device (CBD, MBEC Biofilm Inoculator, Innovotech Inc, Эдмонтон, Канада). Для определения МКЭБ в 96-луночных планшетах биоплёнки *P. aeruginosa* культивировалась в течение 24-х часов как описано выше в разделе 2.5. Сформированные биоплёнки аккуратно отмывались 200 мкл стерильной базовой М63 аналогично вышеописанной методике, за исключением того, что среда из планшета не вытряхивалась, а отбиралась с помощью пипетки, чтобы избежать кросс-контаминации между лунками планшета. После этого в лунки планшета вносилось по 200 мкл серийных двукратных разведений антибиотиков в среде М63, планшет запечатывался парафильмом и инкубировался в течение 24-х часов при 36°C без качания. После инкубирования среда с антибиотиком отбиралась с помощью пипетки

и биоплёнки дважды аккуратно отмывались от остатков антибиотика 200 мкл базовой среды М63. Для возобновления роста биоплёнок, сохранивших жизнеспособность после обработки антибиотиком, в лунки вносилось по 100 мкл питательной среды Difco nutrient broth и планшет инкубировался в течение суток при 36°C без качания. После инкубирования наличие бактериального роста проверялось визуально по наличию мутности, а также с помощью переноса 3 мкл среды на агаризованную питательную среду и детекцией роста на агаризованной питательной среде. МКЭБ определялась как минимальная концентрация антибиотика, после применения которой не наблюдается возобновление роста биоплёнки.

Для определения МКЭБ на CBD биоплёнки культивировались на кольшках CBD, погружённых в лунки 96-луночного планшета, содержащие 150 мкл суспензии бактерий $\sim 3-5 \times 10^7$ КОЕ/мл в среде М63 с добавлением $MgSO_4$, глюкозы и казиминовых кислот. Как и в остальных экспериментах биоплёнки культивировались в течение 24-х часов при 36°C без качания. Для того, чтобы отмыть биоплёнки от планктонных клеток, CBD дважды переносился на 96-луночный планшет с 200 мкл базовой М63 в каждой лунке и инкубировался в течение 1 мин на шейкере при 250 об./мин. После этого CBD переносился на 96-луночный планшет, содержащий по 200 мкл серийных двукратных разведений антибиотиков в среде М63, и инкубировался в течение 24-х часов при 36°C без качания. После этого CBD отмывался от антибиотиков описанным выше образом и переносился на 96-луночный планшет, содержащий по 150 мкл питательной среды Difco nutrient broth, для возобновления роста биоплёнок, сохранивших жизнеспособность. CBD инкубировался в течение 24-х часов при 36°C без качания, после чего определяли бактериальный рост визуально по наличию мутности, а также с помощью переноса 3 мкл среды на агаризованную питательную среду и детекцией роста на агаризованной питательной среде. МКЭБ определялась аналогично эксперименту с 96-луночными планшетами.

Для биоплёнок, культивированных в присутствии галактана, МКЭБ определяли только в 96-луночных планшетах, поскольку при отмывке таких биоплёнок на CBD агрегаты, присутствующие в растворе, налипали на кольшочки CBD.

2.10 Определение количества жизнеспособных бактерий в биоплёнках *P. aeruginosa*

Для того, чтобы определить количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках, биоплёнки культивировались на полипропиленовых купонах в присутствии или отсутствии галактана, как описано выше. После этого купоны промывались стандартным образом и помещались в 1.5 мл микроцентрифужные пробирки, содержащие ~500 мкл стеклянных шариков Ø0.6-0.8 мм и 400 мкл базовой среды М63 (для биоплёнок PAO1) или PBS (для биоплёнок изолята 216). Микроцентрифужные пробирки вортировались в течение 15 секунд при 3500 об./мин на приборе Microspin FV-2400 (Biosan, Рига, Латвия). Количество жизнеспособных бактерий в суспензии бактерий, получившейся после снятия биоплёнки с купона, определялось с помощью посева на агаризованную питательную среду и подсчета колоний (см. раздел 2.7). Минимальное численное значение количества КОЕ, которое возможно было получить при использованных объемах растворов, составляло 40 КОЕ/купон ($1.6 \log_{10}$ КОЕ/купон). На рисунках полученные данные представлены отдельными точками (strip plot) с горизонтальной линией, представляющей среднее значение.

Необходимо отметить, что, когда подобная процедура применялась к планктонным клеткам в качестве контроля, она несколько снижала количество жизнеспособных клеток. Однако, это снижение было относительно невелико (~40-50% в случае PAO1 и ~10% в случае изолята 216) по сравнению с разницей в количестве жизнеспособных клеток в биоплёнках до и после обработки антибиотиками.

Чтобы определить количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках после обработки антибиотиками и антибиотиками в сочетании с галактаном, биоплёнки культивировались на полипропиленовых купонах в присутствии или отсутствии 1 мг/мл галактана в течение 24-х часов. После этого купоны промывались стандартным образом и помещались в 1.5 мл микроцентрифужные пробирки, содержащие 700 мкл раствора антибиотика или антибиотика в сочетании с 1 мг/мл галактана в среде М63. При этом купоны были полностью погружены в раствор антибиотика. В этом

эксперименте использовались следующие концентрации антибиотиков: против биоплёнок PAO1 ципрофлоксацин – 1 мкг/мл, амикацин – 256 мкг/мл; против биоплёнок изолята 216 цефтазидим – 8 мкг/мл, ципрофлоксацин – 4 мкг/мл, амикацин – 256 мкг/мл. Пробирки с купонами, погружёнными в раствор антибиотика, инкубировались в течение 24-х часов при 36°C. После инкубации купоны отмывались от антибиотика стандартным образом, биоплёнки снимались с купонов с помощью вортексирования со стеклянными шариками, как описано выше, и количество жизнеспособных бактерий определялось посевом на агаризованную питательную среду и подсчетом колоний. Чтобы определить наличие жизнеспособных бактерий в количестве ниже порога обнаружения, в пробирки, в которых проходило снятие биоплёнки с купонов, добавлялось по 400 мкл питательной среды Difco nutrient broth, после чего пробирки инкубировались в течение 24-х часов при 36°C. После инкубации наличие бактериального роста определяли по появлению мутности, а также с помощью посева на агаризованную питательную среду.

2.11 Флуоресцентная микроскопия

Биоплёнки PAO1 культивировались на полипропиленовых купонах в течение 24-х часов и обрабатывались 256 мкг/мл амикацина или 256 мкг/мл амикацина с добавлением 1 мг/мл галактана по стандартной методике. После обработки купоны промывались 2 мл стерильной воды и окрашивались флуоресцентными красителями FilmTracer LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit (Molecular Probes, Inc, Юджин, США) в воде в течение 15 минут согласно инструкции производителя. Окрашенные купоны промывались 2 мл воды и визуализировались с использованием EVOS FLoid cell imaging station (ThermoFischer Scientific). Для удобства сравнения изображения были обработаны с помощью программы Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) следующим образом. Сначала с помощью функции «subtract background» с опцией «create background» был выделен фон изображений отдельно для зелёного и красного каналов. Были рассчитаны средние значения интенсивности фона обоих каналов. Затем интенсивность зелёного и красного каналов обоих изображений (биоплёнки, обработанной только амикацином, и биоплёнки, обработанной амикацином в сочетании с галактаном) были нормированы таким образом, чтобы среднее значение

интенсивности фона было одинаковым для обоих каналов обоих изображений. Затем функция «subtract background» была применена для удаления фона, и зелёный и красный каналы были совмещены с получением итогового изображения.

Этот эксперимент не был выполнен для изолята 216, поскольку оказалось, что он очень чувствителен к растворам с низким осмотическим давлением. При этом окраска биоплёнок флуоресцентными красителями проводилась в воде согласно инструкции производителя.

2.12 Клонирование, наработка и очистка лизостафина, дисперсина, Lst-DspB

В качестве последовательности лизостафина была выбрана аминокислотная последовательность из записи P10547 (LSTP_STASI) банка данных Uniprot, аминокислотные остатки 248-493, в качестве последовательности дисперсина – Q840G9_AGGAC, аминокислотные остатки 20-334. Нуклеотидные последовательности соответствующих генов были спланированы аналогично гену *lecA* с учетом оптимальных кодонов и минимальной вторичной структуры мРНК, с добавлением сайтов распознавания рестриктаз BamHI (GGATCC) и BglII (AGATCT) на 5'- и 3'-концах соответственно. Спланированные нуклеотидные последовательности были синтезированы ООО Евrogen (Москва, Россия).

Нуклеотидная последовательность, содержащая ген лизостафина, была клонирована в плазмиду pQE6, последовательность, содержащая ген дисперсина – в плазмиду pQE13, по методикам, использованным при клонировании гена *lecA*. Ген Lst-DspB в плазмиде pQE6 был получен последовательным слиянием генов, кодирующих лизостафин, короткий глицин-сериновый спейсер и дисперсин, с использованием аналогичных генно-инженерных методик. Штаммы-продуценты были получены трансформацией компетентных клеток *E. coli* M15 [pRep4] методом электропорации.

Биомасса штаммов *E. coli*, продуцирующих лизостафин, дисперсин и Lst-DspB была наработана следующим образом. Штаммы-продуценты культивировались в среде LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl) с добавлением 25

мкг/мл канамицина и 150 мкг/мл ампициллина в течение ночи при 37°C и 110 об./мин. После этого бактериальная культура разбавлялась в 100 раз в свежей среде LB с добавлением канамицина и ампициллина и инкубировалась в течение 3-х часов при 37°C и 180 об./мин. Синтез белка индуцировался добавлением ИПТГ до 0.5 мМ, после чего инкубация продолжалась в течение 3-х часов. Биомасса собиралась центрифугированием в течение 30 минут при 4000×g и замораживалась при -20°C для последующей обработки.

Для очистки лизостафина биомасса штамма-продуцента размораживалась, суспендировалась в десятикратном объёме лизирующего буферного раствора (20 мМ Трис, рН 8.0, 100 мМ NaCl, 1 мМ PMSF, 1 мМ MgCl₂, 100 мкг/мл лизоцима, 40 ед./мл бензоназы, 0.1% тритон X-100) и инкубировалась при комнатной температуре в течение 30 минут. После этого лизат разбавлялся в 3 раза буферным раствором, содержащим 20 мМ Трис, рН 7.5, 50 мМ NaCl, центрифугировался при 10000×g в течение 30 минут, супернатант фильтровался через мембрану с диаметром пор 0.44 мкм и наносился на колонку с катионообменным сорбентом WorkBeads 40S (Bio-works, Швеция). Сорбент последовательно промывался буферными растворами, содержащими 20 мМ Трис, рН 7.5, 50 мМ NaCl, 0.1% тритон X-100 и 20 мМ Трис, рН 7.5, 80 мМ NaCl, после чего лизостафин элюировался буферным раствором, содержащим 20 мМ Трис, рН 7.5, 180 мМ NaCl. Элюирующий буферный раствор заменялся на воду с помощью диализа, после чего раствор белка центрифугировался при 10000×g в течение 10 минут, супернатант разделялся на аликвоты и хранился при -80°C.

Для очистки дисперсина размороженная биомасса лизировалась аналогичным образом, к супернатанту после центрифугирования добавлялся раствор имидазола (рН 8.0) до финальной концентрации 25 мМ, после чего супернатант наносился на колонку с металл-хелатным сорбентом WorkBeads 40 Ni-NTA (Bio-works, Швеция), уравновешенную буферным раствором, содержащим 10 мМ имидазола, рН 8.0, 150 мМ NaCl. Сорбент промывался раствором, содержащим 10 мМ имидазола, рН 8.0, 500 мМ NaCl, после чего дисперсин элюировался градиентом имидазола от 10 до 1000 мМ в 150 мМ NaCl. Элюирующий буферный раствор заменялся на 20 мМ HEPES, рН

7.5, с помощью диализа, после чего раствор белка центрифугировался при $10000\times g$ в течение 10 минут, супернатант разделялся на аликвоты и хранился при -80°C .

Для очистки Lst-DspB лизис биомассы проводился аналогичным образом, за исключением того, что концентрация NaCl в лизирующем буфере составляла 50 мМ. Супернатант после центрифугирования наносился на колонку с катионообменным сорбентом WorkBeads 40S (Bio-works, Швеция) и Lst-DspB элюировался градиентом от 50 до 500 мМ NaCl в 10 мМ Трис, рН 7.5. Элюат диализовался, разделялся на аликвоты и хранился аналогично остальным белкам.

2.13 Определение пептидазной активности лизостафина и Lst-DspB

Для определения протеолитической активности лизостафина и Lst-DspB была использована разработанная ранее методика (Grishin *et al.*, 2020). В качестве субстрата использовался пентаглициновый пептид (sc-471644A, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США). Для приготовления стокового раствора пентаглицинового пептида суспензия пептида в концентрации 5 мМ в воде инкубировалась при 99°C в течение 20 минут, после чего разделялась на аликвоты и хранилась при -80°C . Перед экспериментом аликвота пептида размораживалась в течение 20 минут при 99°C и смешивалась с растворами рекомбинантных белков и буферным раствором HEPES таким образом, что конечная реакционная смесь содержала 4 мМ пентаглицинового пептида, 3 мкМ лизостафина или Lst-DspB, 20 мМ HEPES, рН 7.5. Реакционная смесь разделялась на аликвоты по 20 мкл, часть которых замораживалась при -80°C , а другая часть инкубировалась в течение 30 часов при 37°C . После инкубации аликвоты также замораживались для остановки реакции и хранения до последующего анализа. Для определения степени гидролиза пентаглицинового пептида аликвоты реакционной смеси размораживались в течение 10 минут при 99°C , смешивались со 100 мкл 0.4% раствора нингидрина в 80% ДМСО / 20% воды с 20 мМ HEPES, рН 7.5, и инкубировались при 85°C в течение 15 минут. После инкубации аликвоты охлаждались до комнатной температуры и смешивались с 200 мкл воды. По 100 мкл полученной смеси переносились в лунки 96-луночного планшета и оптическая плотность при длине волны 550 нм определялась с помощью планшетного ридера iMark (Bio-Rad, США).

2.14 Определение гликозидгидролазной активности дисперсина и Lst-DspB

Для определения гликозидгидролазной активности дисперсина и Lst-DspB была применена стандартная методика с использованием *p*-нитрофенил N-ацетил- β -D-глюкозаминида в качестве субстрата. *p*-нитрофенил N-ацетил- β -D-глюкозаминид (N9376, Sigma-Aldrich, США) растворялся в буферном растворе 20 мМ HEPES, pH 7.5, 0.1% BSA в концентрации 10 мМ, после чего смешивался с разными концентрациями дисперсина или Lst-DspB (конечные концентрации белков 0, 0.25, 0.5 и 1 мкМ, *p*-нитрофенил N-ацетил- β -D-глюкозаминида 9 мМ) и инкубировался в течение 1 часа при 37°C и 300 об./мин. Для остановки реакции и проявления окраски к реакционной смеси добавлялось 10 мкл 1 М NaOH, и оптическая плотность при длине волны 405 нм определялась с помощью планшетного ридера iMark (Bio-Rad, США). Количество расщеплённого *p*-нитрофенил N-ацетил- β -D-глюкозаминида рассчитывалось исходя из коэффициента молярной экстинкции *p*-нитрофенола 18000 М⁻¹ с⁻¹ при 405 нм.

2.15 Определение бактериолитической активности лизостафина и Lst-DspB

Для определения бактериолитической активности лизостафина и Lst-DspB использовалась методика, основанная на просветлении суспензии бактериальных клеток под действием исследуемых белков. *S. aureus* ATCC 29213 культивировался в течение ночи в среде, содержащей 20 г/л пептона, 5 г/л NaCl и 2.5 г/л K₂HPO₄, при 37°C и 110 об./мин. Бактериальные клетки осаждались центрифугированием при 4000×g в течение 5 мин, ресуспендировались в буферном растворе, содержащем 20 мМ HEPES, pH 7.5, 150 мМ NaCl, снова осаждались центрифугированием и ресуспендировались в растворе 20 мМ HEPES, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% BSA до мутности, соответствующей 4.0 по МакФарланду. По 180 мкл бактериальной суспензии помещалось в лунки 96-луночного планшета, после чего в лунки добавлялось по 20 мкл разных концентраций лизостафина или Lst-DspB, и планшет инкубировался в течение 1 часа при 37°C с постоянным перемешиванием и измерением оптической плотности при 550 нм каждую минуту с помощью планшетного ридера Multiscan FC (Thermo Scientific, США). Для расчета бактериолитической активности кривая зависимости мутности бактериальной

суспензии от времени аппроксимировалась пятипараметрическим логистическим уравнением, и за скорость просветления суспензии принимался наклон кривой в точке перегиба. Зависимость скорости просветления суспензии от концентрации фермента (лизостафина или Lst-DspB) рассчитывалась на основе скорости просветления суспензии при разных концентрациях фермента.

2.16 Определение МИК лизостафина, Lst-DspB и диопсида

Для определения минимальной ингибирующей концентрации *S. aureus* ATCC 29213 культивировался на агаризованной среде ВНИ (BD, США) в течение ночи, после чего суспендировался в физиологическом растворе до мутности, соответствующей 0.5 по МакФарланду. Полученная суспензия разбавлялась в 300 раз в среде Мюллер-Хинтон (BD, США) с добавлением 2% NaCl и 0.1% BSA, и по 90 мкл итоговой суспензии помещалось в лунки 96 луночного планшета. К бактериальной суспензии добавлялось по 10 мкл серийных двукратных разведений лизостафина, Lst-DspB или диопсида с адсорбированным лизостафином. Планшет инкубировался при 37°C и 300 об./мин в течение 24 часов, после чего минимальная ингибирующая концентрация определялась как минимальная концентрация исследуемого вещества, при которой в лунках отсутствует видимый бактериальный рост.

2.17 Культивация и разрушение биоплёнок *S. aureus*

Биоплёнки *S. aureus* культивировались в нескольких вариантах питательной среды, а также на двух вариантах поверхности (в лунках 96-луночных планшетов и на покровных стеклах). Для этого *S. aureus* ATCC 29213 культивировался в течение ночи на агаризованной питательной среде, содержащей 20 г/л пептона, 5 г/л NaCl и 2.5 г/л K_2HPO_4 . Клетки *S. aureus* суспендировались в физиологическом растворе до мутности, соответствующей 0.5 по МакФарланду, после чего разбавлялись в 300 раз в среде для культивирования биоплёнок. Для культивации биоплёнок на покровных стеклах использовалась среда TSB (BD, США) с добавлением 1% глюкозы. По 3 мл итоговой суспензии бактерий добавлялось в лунки 6-луночного планшета (Costar 3506, Corning, США). В лунки планшета помещались покровные стекла, и планшет инкубировался 24 часа при 37°C. После инкубации покровные стекла аккуратно

промывались в TBS (50 мМ Трис, рН 7.5, 150 мМ NaCl) и помещались в лунки планшета, содержащие 3 мл TBS с добавлением или без добавления 2 мкг/мл лизоцифа. Планшет инкубировался 2 часа при 37°C, после чего стекла аккуратно промывались TBS, высушивались, фиксировались в течение 1 часа при 60°C и окрашивались в течение 15 минут 0.4% раствором кристаллического фиолетового. Для культивации биоплёнок в 96-и луночных планшетах использовалась среда TSB с добавлением 1% глюкозы и 2% NaCl, с добавлением или без добавления 1.5% инактивированной гепаринизированной крысиной плазмы крови. По 200 мкл итоговой бактериальной суспензии помещалось в лунки 96-и луночного планшета (Costar 3599, Corning, США), и планшет инкубировался при 37°C в течение 24 часов. После инкубации биоплёнки промывались 250 мкл физиологического раствора, после чего в лунки планшета добавлялось по 200 мкл TBS, содержащего необходимую концентрацию исследуемых белков (лизоцифа, дисперсин, Lst-DspB) и планшет инкубировался при 37°C в течение 2 часов. Затем биоплёнки снова промывались физиологическим раствором, высушивались, фиксировались при 60°C в течение 1 часа и окрашивались 0.4% раствором кристаллического фиолетового. Для определения количества связавшегося с биоплёнкой красителя в лунки планшета добавлялось по 100 мкл 30% уксусной кислоты, планшет инкубировался 10 минут, содержимое лунок перемешивалось пипетированием, по 25 мкл содержимого лунок переносилось в новый 96-луночный планшет к 75 мкл 30% уксусной кислоты (разведение в 4 раза), и оптическая плотность при длине волны 550 нм определялась на планшетном ридере iMark (Bio-Rad, США).

Для культивации биоплёнок в 24-х луночных планшетах использовалась аналогичная методика, за исключением того, что в лунки планшета добавлялось по 800 мкл бактериальной суспензии. Кроме того, для тестирования антибиоплёночной активности диоксида с адсорбированным лизоцифом диоксид помещался не напрямую в лунки планшета, а в специальные вкладыши SPLInsert 24-well (SPL, Республика Корея) с мембранным дном с диаметром пор 3 мкм. Вкладыши с диоксидом помещались в лунки планшета, содержащие биоплёнку, и биоплёнка инкубировалась в присутствии диоксида в течение 24-х часов вместо 2-х часов, чтобы позволить адсорбированному лизоцифу полностью выйти из диоксида. В качестве

положительного контроля биоплёнка инкубировалась в течение 24-х часов в присутствии свободного лизоцима.

2.18 Адсорбция белков на диопсид

Порошок диопсида был получен твердофазным методом с использованием в качестве исходных компонентов биоотходов – рисовой шелухи и яичной скорлупы, и предоставлен сотрудниками НИТУ МИСиС (Карягина и др., 2022). Для промывки диопсида 10 мг порошка диопсида инкубировалось в буферном растворе, содержащем 10 мМ Трис, pH 7.5, в течение 10 минут, после чего диопсид осаждался центрифугированием при $16873 \times g$ в течение 10 минут. К осаждённому порошку добавлялся лизоцим или дисперсин в количестве 100 мкг белка в 250 мкл буферного раствора 10 мМ Трис, pH 7.5, после чего смесь инкубировалась в течение 2 часов с постоянным перемешиванием. Затем диопсид осаждался центрифугированием при $16873 \times g$ в течение 15 минут и супернатант, содержащий не связавшийся белок, отбирался для определения концентрации по методу Брэдфорда, а также для анализа в полиакриламидном гель-электрофорезе. Диопсид промывался в 250 мкл буферного раствора 10 мМ Трис, pH 7.5, после чего промывочный раствор также отбирался для анализа. Количество адсорбированного белка вычислялось как разница между количеством исходного белка и количеством не связавшегося белка и белка, оставшегося в промывочном буфере. Для визуализации связавшегося белка к диопсиду добавлялся буфер для электрофореза, содержащий SDS и меркаптоэтанол, и образцы прогревались при 95°C в течение 10 минут.

2.19 Кинетика выхода белков с диопсида

Порошок диопсида с адсорбированными на нем белками инкубировался в PBS, pH 7.4, с добавлением 1 мг/мл BSA при 37°C с постоянным перемешиванием. Через 0, 1, 3, 5, 24, 48 и 72 часа диопсид осаждался центрифугированием, супернатант отбирался и замораживался для хранения и последующего анализа. К порошку добавлялся свежий буферный раствор, после чего инкубация продолжалась.

2.20 Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) использовался для определения концентрации лизоцифа, вышедшего с диопсида. Для этого кроличья сыворотка, содержащая поликлональные антитела к лизоцифу, разбавлялась в 500 раз в 20 мМ карбонат-бикарбонатном буферном растворе, pH 9.7, и добавлялась в лунки 96-и луночного планшета (Corning, США) по 100 мкл, после чего планшет инкубировался в течение суток при +4°C. Планшет промывался дважды 200 мкл PBS, pH 7.4, с добавлением 0.05% Твин-20 (PBST) и блокировался раствором 1 мг/мл BSA в PBST в течение 2-х часов при 37°C. После этого планшет снова промывался дважды, в лунки планшета добавлялись образцы, содержащие лизоциф, и планшет инкубировался в течение суток при +4°C. Планшет промывался три раза, в лунки планшета добавлялось по 100 мкл моноклональных антител к лизоцифу в PBS (клон 2F9, ФГБУ Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия) и планшет снова инкубировался в течение суток при +4°C. Затем планшет промывался четыре раза PBST, в лунки планшета добавлялись вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия) и планшет инкубировался при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывался пять раз PBST, после чего в лунки добавлялся субстрат пероксидазы хрена ТМВ и планшет инкубировался при 37°C и 400 об./мин в течение 25 минут. Для остановки реакции в лунки планшета добавлялось по 100 мкл 2 М H₂SO₄, и оптическая плотность измерялась при 450 нм на планшетном ридере iMark (Bio-Rad, США). Концентрации лизоцифа рассчитывались с помощью калибровочной кривой.

2.21 Оценка антибактериальной активности лизоцифа по зонам лизиса

Для оценки антибактериальной активности лизоцифа, вышедшего с диопсида, использовался метод с формированием зон лизиса бактериальных клеток, культивированных на твердой питательной среде. Для этого клетки *S. aureus* ATCC 29213 культивировались в течение суток при 37°C на агаризованной среде TSB без глюкозы (BD, США), суспендировались в физиологическом растворе до мутности, соответствующей 0.5 по МакФарланду, и полученная суспензия равномерно наносилась на чашки Петри с агаризованной средой Мюллера-Хинтона II (BD, США).

После полного впитывания жидкости, на поверхность среды наносилось по 10 мкл образцов, содержащих лизостафин, и чашки инкубировались при 37°C в течение суток. Активность лизостафина определялась по отсутствию бактериального роста в месте нанесения образца.

2.22 Статистический анализ

Статистический анализ проводился в программе Microsoft Excel с использованием дополнения Real Statistics Resource Pack Excel add-on (Release 4.7, Copyright (2013 – 2017) Charles Zaiontz. www.real-statistics.com). Для того, чтобы обеспечить возможность использования стандартных методов статистического анализа, перед проведением статистической обработки данные КОЕ/мл подвергались логарифмической трансформации (значения КОЕ/мл заменялись на их десятичные логарифмы). После этого соответствие данных нормальному распределению проверялось с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для определения статистической значимости различий между группами при нормальном распределении данных использовался двусторонний критерий Стьюдента (t -тест) с неравными дисперсиями. Для определения статистической значимости различий между группами в эксперименте с определением количества жизнеспособных бактерий в биоплёнках, обработанных антибиотиками, использовался двусторонний критерий Манна-Уитни. Различия считались значимыми при значениях $p < 0.05$, с учетом поправки Данна-Шидака на множественные сравнения.

Глава 3. Результаты

3.1 Клонирование, наработка и выделение LecA

Для исследования взаимодействия растительных олиго- и полисахаридов с лектином LecA было необходимо получить LecA в очищенном виде. Для этого последовательность ДНК, кодирующая LecA, была синтезирована, клонирована в плазмидный вектор и трансформирована в штамм-продуцент *E. coli*.

В качестве исходной последовательности была взята аминокислотная последовательность белка LecA из записи Q05097 (PA1L_PSEAE) банка данных UniProt (www.uniprot.org). Последовательность была дополнительно фланкирована остатками MGS на N-конце и RS на C-конце для того, чтобы внести в нуклеотидную последовательность сайты рестриктаз BamHI (GGATCC) и BglII (AGATCT) соответственно. Подобный подход является стандартным в лаборатории биологически-активных наноструктур НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, где была выполнена работа, и применяется для всех рекомбинантных белков, поскольку в последующем существенно упрощает процедуру создания химерных конструкций. Нуклеотидная последовательность гена *lecA* была спланирована с использованием оптимальных кодонов для экспрессии в *E. coli*, а также с учетом отсутствия выраженной вторичной структуры мРНК. Синтезированная нуклеотидная последовательность, кодирующая белок LecA, была клонирована в плазмиду pQE13 под промотор фага T5 с получением плазмиды pLecA. За счет этого на N-конец белка был добавлен гексагистидиновый таг. Идентичность нуклеотидных последовательностей запланированным была подтверждена секвенированием.

Штамм *E. coli* M15[pRep4] был трансформирован плазмидой pLecA с получением штамма *E. coli* M15[pRep4, pLecA]. Уровень продукции рекомбинантного белка LecA в полученном штамме представлен на рис. 9.

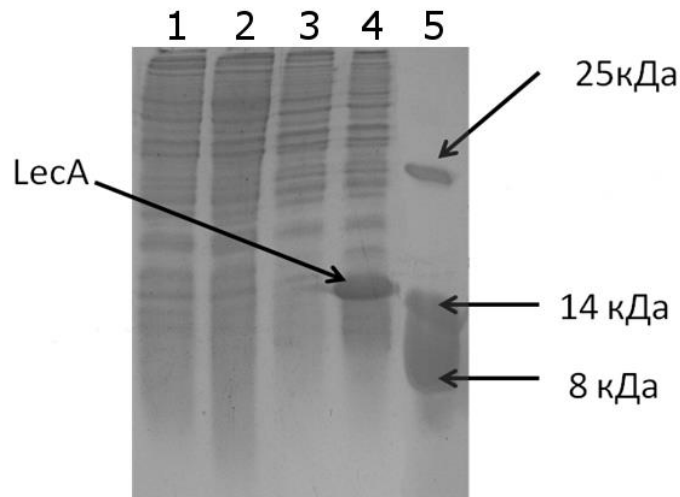


Рисунок 9. Экспрессия рекомбинантного LecA в *E. coli* M15 [pRep4, pLecA] (электрофорез в 17 % ПААГ по Лэммли). 1 – *E. coli* M15 [pRep4] до индукции; 2 – *E. coli* M15 [pRep4] после индукции; 3 – *E. coli* M15 [pRep4, pLecA] до индукции; 4 – *E. coli* M15 [pRep4, pLecA] после индукции; 5 – маркеры молекулярного веса 8 кДа, 14 кДа и 25 кДа.

Рекомбинантный LecA синтезируется преимущественно в нерастворимой форме и накапливается в тельцах включения. Тельца включения были растворены с помощью раствора 8 М мочевины, после чего белок был очищен с помощью металло-аффинной хроматографии (рис. 10).

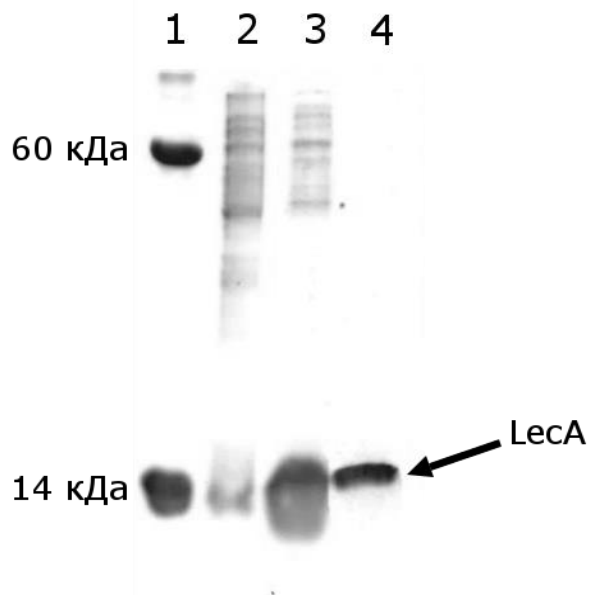


Рисунок 10. Очистка рекомбинантного LecA (электрофорез в 17% ПААГ по Лэммли). 1 – маркеры молекулярного веса 14 и 60 кДа; 2 – лизатный супернатант LecA; 3 – лизатный осадок (тельца включения) LecA; 4 – очищенный рекомбинантный белок LecA.

3.2 Тестирование олигосахаридов на способность связываться с LecA

Была предпринята попытка найти эффективные блокаторы функций LecA среди коммерчески доступных растительных олигосахаридов. Для этого были использованы три растительных олигосахаридов: 6^1 - α -D-галактозил-маннотриоза, $6^3,6^4$ - α -D-дигалактозил-маннопентаоза и вербаскоза. Первые два олигосахаридов представляют собой продукты энзиматического гидролиза галактоманнана рожкового дерева (сacob galactomannan) разной длины. 6^1 - α -D-галактозил-маннотриоза (далее просто галактозил-маннотриоза) содержит три остатка маннозы, соединённых $\alpha 1 \rightarrow 4$ связями, один из которых дополнительно несет остаток галактозы в 6-ом положении; $6^3,6^4$ - α -D-дигалактозил-маннопентаоза (далее дигалактозил-маннопентаоза) имеет аналогичную структуру, за исключением того, что состоит из пяти остатков маннозы, два из которых несут остатки галактозы (рис. 11). Вербаскоза представляет собой линейный пентасахарид, синтезируемый различными бобовыми растениями, и состоит из трёх остатков галактозы, соединённых $\alpha 1 \rightarrow 6$ связями, одного остатка глюкозы и одного остатка фруктозы (рис. 11). Все три олигосахаридов содержат концевые невосстанавливающие остатки галактозы (дигалактозил-маннопентаоза содержит два таких остатка), и, таким образом, потенциально могут взаимодействовать с LecA.

Способность растительных олигосахаридов взаимодействовать с LecA была исследована с помощью методов ингибирования гемагглютинации и изотермальной титрационной калориметрии.

За счет своей способности связывать галактозу, входящую в состав гликопротеинов и гликолипидов человеческих эритроцитов, а также благодаря своей тетрамерной структуре, LecA способен агглютинировать человеческие эритроциты (Gilboa-Garber, 1972). При этом блокирование взаимодействия LecA с эритроцитами за счет добавления избытка низкомолекулярных лигандов, таких как галактоза, предотвращает агглютинацию эритроцитов. Эти свойства сохранялись у использованного в данной работе рекомбинантного LecA.

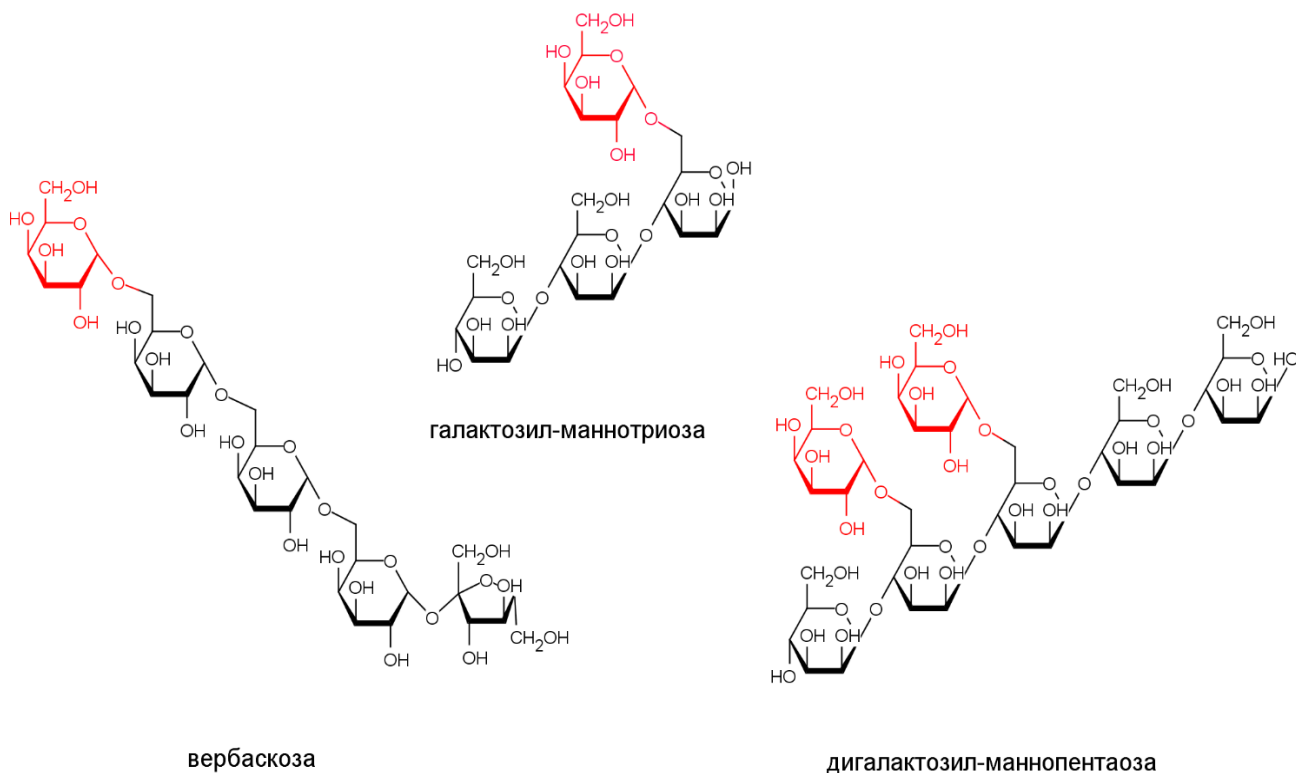


Рисунок 11. Структурные формулы олигосахаридов, использованных в данной работе. Красным цветом выделены концевые остатки галактозы.

Все три олигосахариды оказались способны подавлять агглютинацию эритроцитов, вызванную LecA. Ингибирующая концентрация галактозил-маннотриозы оказалась равна 0.25 мМ, дигалактозил-маннопентаоза и вербаскоза подавляли агглютинацию в концентрации 0.5 мМ. При этом частичное ингибирование гемагглютинации вербаскозой заметно уже в концентрации 0.13 мМ, а дигалактозил-маннопентаозой – 0.063 мМ (рис. 12).

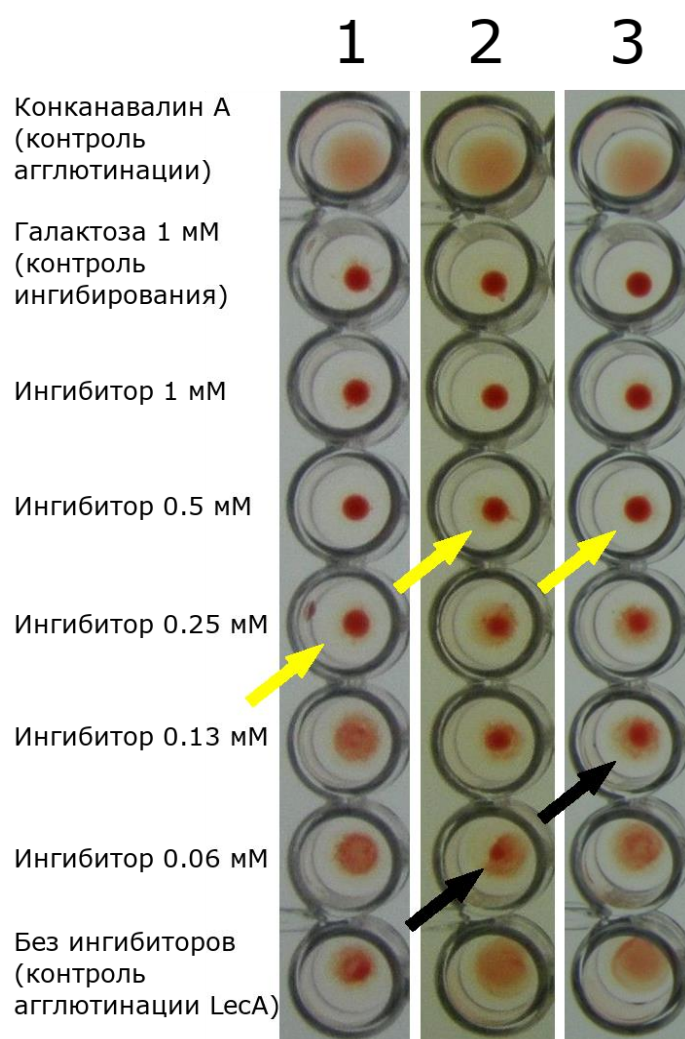


Рисунок 12. Ингибирование гемагглютинации, вызванной LecA, с помощью растительных олигосахаридов. Вертикальные ряды: 1 – галактозил-маннотриоза, 2 – дигалактозил-маннопентаоза, 3 – вербаскоза. В качестве контроля реакции гемагглютинации использовался конканавалин А (10 мкг/мл), в качестве контрольного ингибитора гемагглютинации, вызванной LecA – галактоза (1 мМ). Желтыми стрелками отмечены лунки с минимальными концентрациями олигосахаридов, подавляющими гемагглютинацию; черными стрелками отмечены лунки с минимальными концентрациями олигосахаридов, частично подавляющими гемагглютинацию.

За счет постепенного насыщения сайтов связывания при каждой последующей инъекции все меньшее количество титранта взаимодействует с белком, благодаря чему график зависимости выделенного тепла от молярного соотношения ингибитор/белок (кривая титрования) приобретает характерную форму S-образной кривой. С помощью анализа кривой титрования ИТС можно оценить такие параметры межмолекулярных взаимодействий, как константа ассоциации, стехиометрия и

энтальпия. Зная эти параметры, можно рассчитать также и энтропийную составляющую свободной энергии взаимодействия.

Для анализа результатов ИТС необходимо знать точные концентрации взаимодействующих веществ. Хотя общая концентрация рекомбинантного ЛесА может быть определена стандартными биохимическими методами, в процессе очистки белок проходит стадию рефолдинга из телец включения, в связи с чем необходимо определить концентрацию правильно фолдированного и способного связывать лиганды белка.

Для этого можно использовать данные о титровании белка известным лигандом. Поскольку одним из параметров, получаемых с помощью ИТС, является стехиометрия связывания, то, точно зная концентрацию одного из взаимодействующих веществ, можно определить концентрацию другого, при условии, что стехиометрия взаимодействия известна заранее. Из литературы известно, что ИПТГ связывается с ЛесА в соотношении 1:1. Таким образом, полученная в результате эксперимента по титрованию ИПТГ против ЛесА стехиометрия будет свидетельствовать о количестве белка, способного связывать ИПТГ. Общая концентрация ЛесА равнялась 278 мкМ (4 мг/мл), при этом стехиометрия связывания оказалась равна 0.69 ± 0.05 , что дает концентрацию активного белка равную 192 ± 13.4 мкМ. При этом константа диссоциации и энтальпия взаимодействия оказались равны 31.0 ± 3.1 мкМ и -9.00 ± 0.13 ккал/моль соответственно, что хорошо соответствует литературным данным (32.4 ± 2.7 мкМ и -8.9 ± 0.5 ккал/моль (Kadam *et al.*, 2011)).

Калориметрия показала, что все три олигосахарида эффективно взаимодействуют с рекомбинантным ЛесА. Примеры термограмм и кривых титрования показаны на рис. 13-15, параметры взаимодействий представлены в таблице 3.

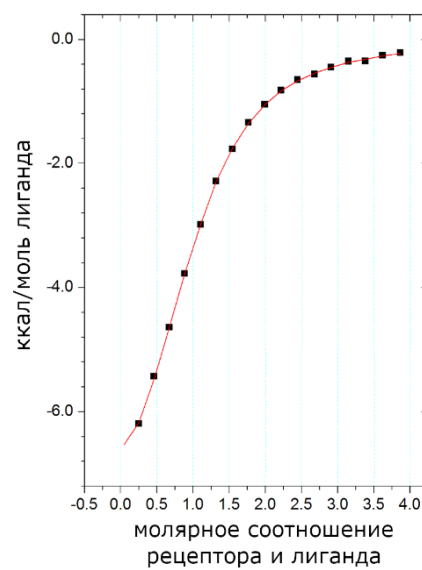
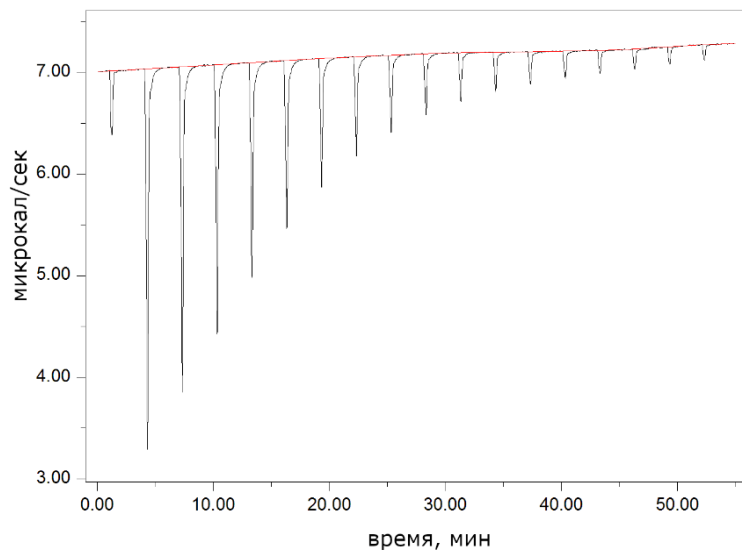


Рисунок 13. Пример термограммы (слева) и кривой титрования (справа) галактозилманнотриозы против Lc6A.

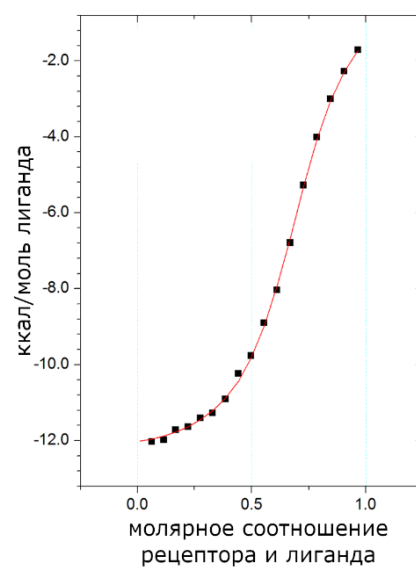
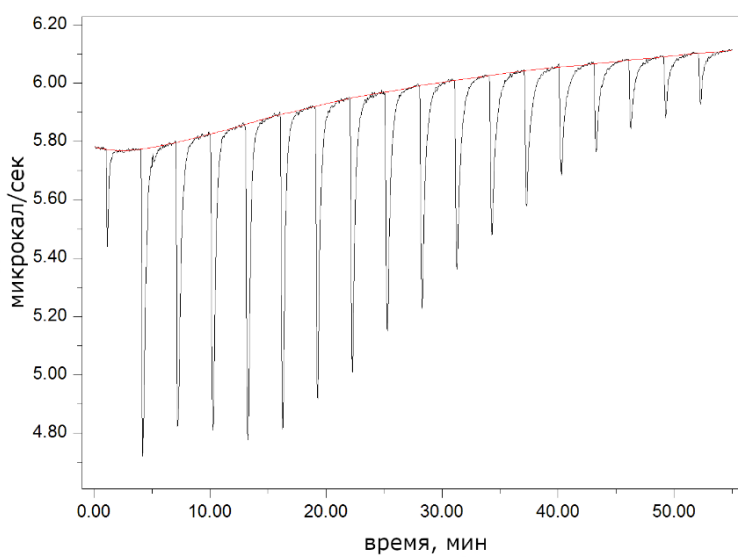


Рисунок 14. Пример термограммы (слева) и кривой титрования (справа) дигалактозилманнопентаозы против Lc6A.

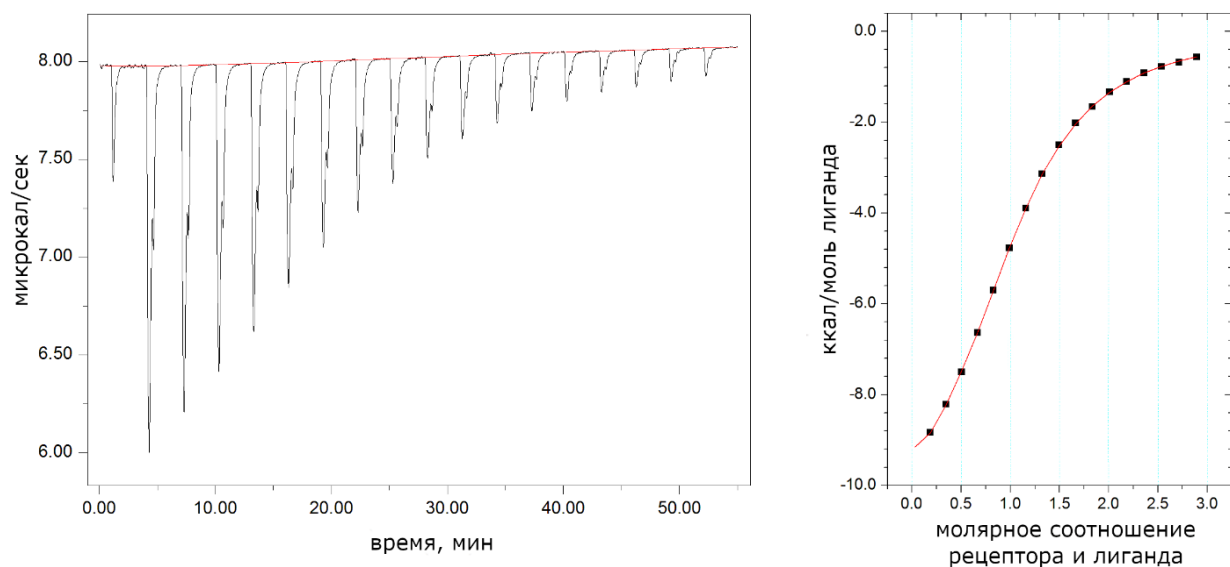


Рисунок 15. Пример термограммы (слева) и кривой титрования (справа) вербаскозы против LecA.

Таблица 3. Параметры взаимодействия LecA с олигосахаридами по результатам калориметрии. Для сравнения также добавлены данные по связыванию ИПТГ и галактозы.

Лиганд	K_D , мкМ	ΔH , ккал/моль	$-T\Delta S$, ккал/моль ³	Стехиометрия
Галактоза ¹	87.5 ± 3.5	-8.4 ± 0.1	2.3	1.10 ± 0.10
ИПТГ ²	31.0 ± 3.1	-9.0 ± 0.1	2.8	1.00 ± 0.07
Вербаскоза	42.8 ± 6.2	-10.8 ± 0.6	4.8	0.97 ± 0.13
Галактозил-маннотриоза	64.2 ± 11.7	-8.6 ± 0.5	2.8	1.09 ± 0.13
Дигалактозил-маннопентаоза	4.1 ± 0.4	-12.2 ± 0.21	4.8	0.67 ± 0.05

¹из публикации (Kadam *et al.*, 2011); ²стехиометрия связывания ИПТГ принята за 1.0; ³значения рассчитаны по формулам $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ и $\Delta G = RT \ln K_D$

Сила взаимодействия галактозил-маннотриозы с LecA практически не отличалась от таковой для галактозы ($K_D=64.2$ мкМ). Чуть большую аффинность продемонстрировала вербаскоза ($K_D=42.8$ мкМ). Наиболее интересные результаты наблюдаются в случае с дигалактозил-маннопентаозой. Несмотря на то, что с точки зрения химического строения галактозил-маннотриоза и дигалактозил-маннопентаоза практически не отличаются, константа диссоциации дигалактозил-маннопентаозы на порядок меньше ($K_D=4.1$ мкМ) константы диссоциации галактозил-маннотриозы. Кроме того, стехиометрия связывания дигалактозил-маннопентаозы значительно отличается от 1 и равна 0.67. Такая разница в аффинности и стехиометрии связывания скорее всего объясняется разницей в количестве концевых остатков галактозы. Параметр стехиометрии, получаемый в ИТС, показывает количество молекул лиганда, приходящихся на один сайт связывания белка. Таким образом, стехиометрия 0.67 говорит о том, что одна молекула дигалактозил-маннопентаозы связывает в среднем 1.5 молекулы LecA. Иначе говоря, часть молекул дигалактозил-маннопентаозы связывается с двумя молекулами LecA одновременно.

Во многих случаях взаимодействия мультивалентного лиганда с мультивалентным же лектином при определённых соотношениях их концентраций происходит нековалентная «перешивка» (cross-linking) молекул белка и лиганда с образованием пространственной «сетки» (lattice), что может приводить к выпадению всего комплекса в осадок (Dam, Brewer, 2010). Чтобы проверить, обладает ли дигалактозил-маннопентаоза способностью «перешивать» LecA, лектин был инкубирован в присутствии дигалактозил-маннопентаозы, дигалактозил-маннотриозы или без добавления олигосахаридов. Как видно из рисунка 12, при инкубации LecA с избытком дигалактозил-маннопентаозы, но не галактозил-маннотриозы или в отсутствие каких-либо лигандов, образуются видимые невооружённым глазом агрегаты (отмечено стрелкой).

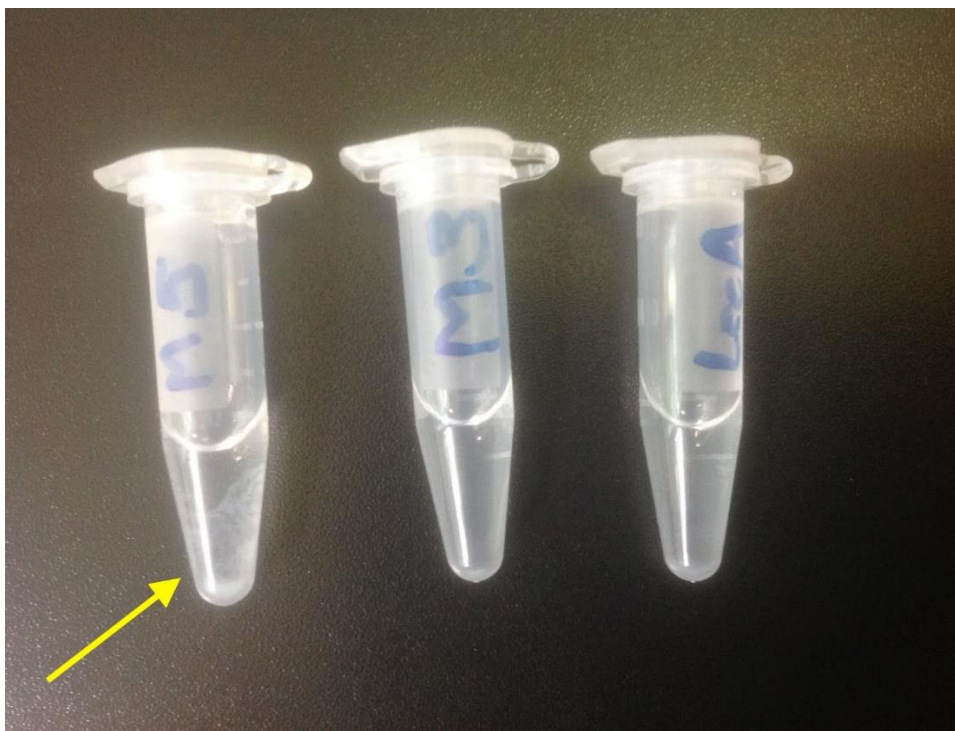


Рисунок 16. Результат инкубирования белка LecA (8 мг/мл) с олигосахаридами (5 мМ) в течение суток. Слева направо: с дигалактозил-маннопентаозой, с галактозил-маннотриозой, без добавления олигосахаридов.

Таким образом, все три протестированных растительных олигосахарида оказались способны взаимодействовать с LecA, при этом наиболее высокой аффинностью обладала дигалактозил-маннопентаоза, вероятно за счет способности связывать две молекулы LecA одновременно.

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

Дигалактозил-маннотриоза, как олигосахарид, имеющий наибольшую аффинность к LecA, была протестирована на способность подавлять образование биоплёнок двумя штаммами *P. aeruginosa*: лабораторным штаммом PAO1 и клиническим изолятом 216, с помощью окраски биоплёнок кристаллическим фиолетовым. Оказалось, что добавление 0.2% дигалактозил-маннопентаозы (~1.7 мМ) не подавляет образование биоплёнок ни одним из штаммов. Напротив, дигалактозил-маннопентаоза оказывает небольшой, но статистически значимый стимулирующий эффект на образование биоплёнок обоими штаммами (рис. 17). Для этого

эксперимента была взята максимально возможная концентрация дигалактозил-маннопентаозы исходя из её доступного количества.

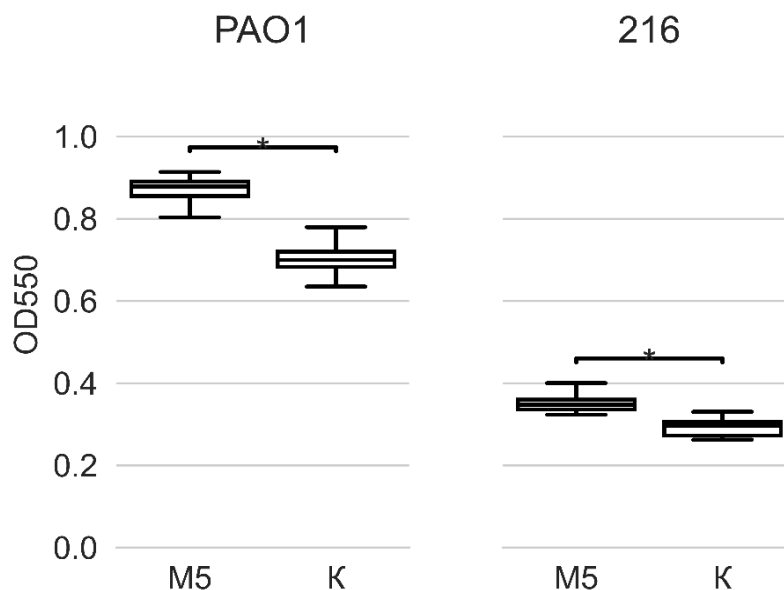


Рисунок 17. Образование биоплёнок двумя штаммами *P. aeruginosa* в присутствии дигалактозил-маннопентаозы (окраска кристаллическим фиолетовым). М5 – 2 мг/мл дигалактозил-маннопентаозы, К – без добавления олиго- или полисахаридов. * - статистически значимые различия.

3.4 Тестирование полисахаридов на способность связываться с LecA

Далее была исследована способность взаимодействовать с LecA и ингибировать образование биоплёнок панели коммерчески доступных природных полисахаридов. В данной работе были использованы галактан и рамногалактоуронан картофеля, галактоманнан гуара, арабиногалактан лиственницы, а также глюкоманнан *Amorphophallus konjac* и глюканы ячменя и ламинарии (ламинарин) в качестве контрольных полисахаридов, не содержащих остатки галактозы. Галактан и галактоманнан ингибировали гемагглютинацию, вызываемую LecA, в то время как глюкан ламинарин не оказывал никакого влияния. Остальные полисахариды сами приводили к агглютинации эритроцитов, а рамногалактоуронан картофеля вызывал гемолиз.

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

Все полисахариды были протестированы на способность подавлять биоплёнки *P. aeruginosa*. Для первого – скринингового – тестирования был использован клинический изолят *P. aeruginosa* 216, биоплёнки культивировались 5 часов в среде LB на стенках лунок 96-луночных планшетов.

Галактан картофеля практически полностью подавлял формирование биоплёнок *P. aeruginosa* 216 в протестированных концентрациях (1.25-5 мг/мл) (рис. 18). Определённым ингибирующим эффектом также обладали галактоманнан гуара и глюкоманнан *A. konjac*, хотя этот эффект был существенно менее выраженным (рис. 18).

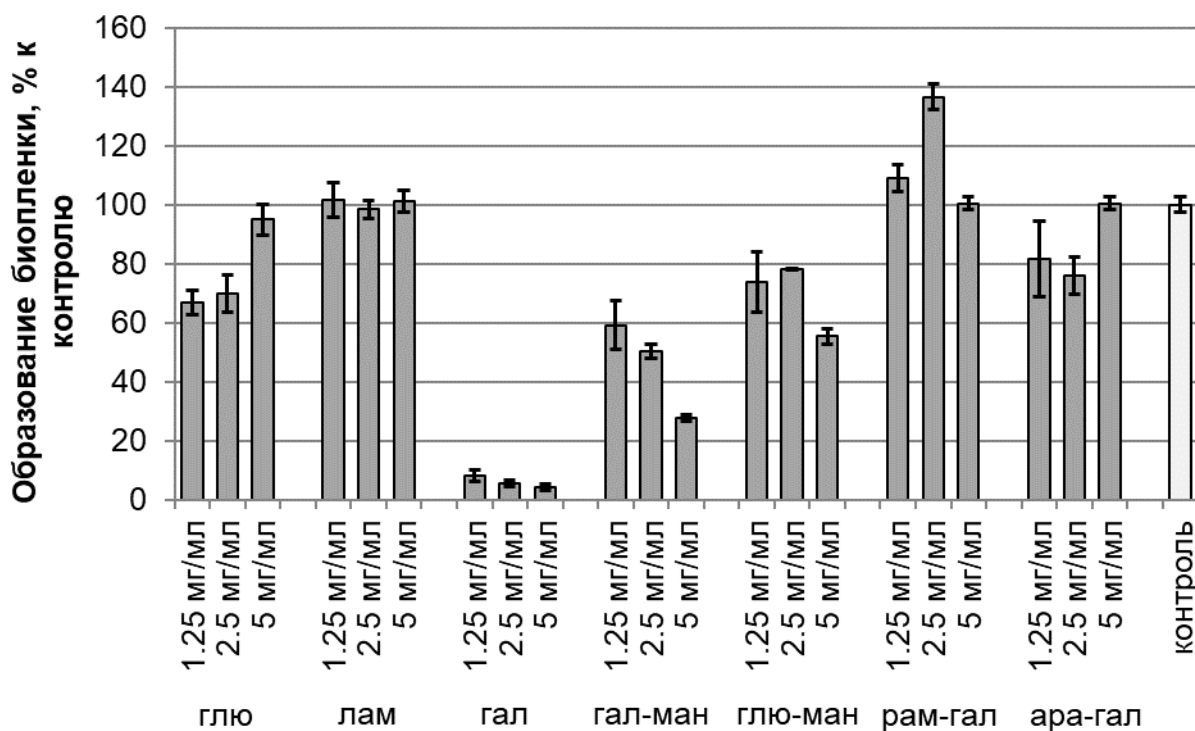


Рисунок 18. Образование биоплёнок изолятом *P. aeruginosa* 216 в 96-луночных планшетах в присутствии различных полисахаридов (окраска кристаллическим фиолетовым). Глю – глюкан ячменя, лам – ламинарин, гал – галактан картофеля, гал-ман – галактоманнан гуара, глю-ман – глюкоманнан *A. konjac*, рам-гал – рамногалактоуронан картофеля, ара-гал – арабиногалактан лиственницы, контроль – биоплёнка без добавления полисахаридов. Данные представлены в виде средних значений, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

Для дальнейших экспериментов был выбран галактан картофеля как полисахарид, наиболее эффективно подавляющий образование биоплёнок *P. aeruginosa*.

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

Для детального изучения влияния галактана на биоплёнки *P. aeruginosa* была использована модифицированная методика культивирования биоплёнок. Среда культивирования была заменена на минимальную среду М63. Использование этой среды стимулирует образование биоплёнок *P. aeruginosa* (Mah, 2014; O'Toole, 2011). Время культивирования было увеличено до 24-х часов. В случае *P. aeruginosa* учет сформированной биоплёнки через 5 часов показывает влияние исследуемого соединения на начальную скорость образования биоплёнки. Культивация биоплёнки в течение 24-х часов позволяет оценить более долговременный эффект. В качестве контрольного полисахарида был выбран глюкан ячменя.

Несмотря на изменение методики культивирования биоплёнок, галактан картофеля, использованный в концентрации 1 мг/мл, но не контрольный полисахарид глюкан ячменя в той же концентрации, подавлял образование биоплёнок обоих штаммов *P. aeruginosa* на стенках 96-луночных планшетов (рис. 19). Необходимо отметить, что глюкан ячменя в данных условиях несколько стимулировал образование биоплёнок изолятом 216, однако этот эффект далее не изучался.

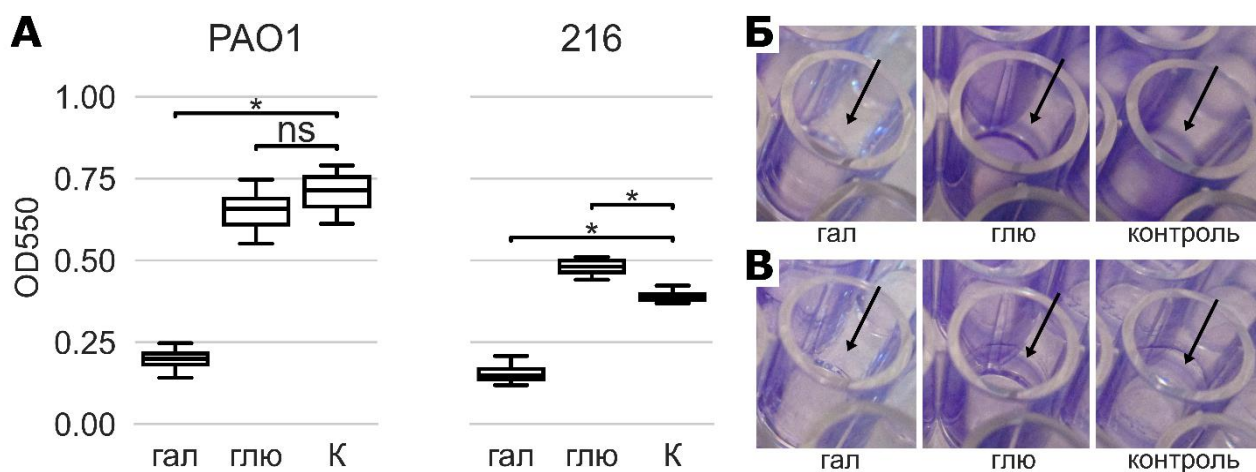


Рисунок 19. Образование биоплёнок двумя штаммами *P. aeruginosa* в присутствии полисахаридов галактана и глюкана в 96-луночных планшетах. А – окраска кристаллическим фиолетовым; гал – 1 мг/мл галактана, глю – 1 мг/мл глюкана, К – контроль без полисахарида. Б, В – фотографии биоплёнок PAO1 (Б) и изолята 216 (В) в лунках 96-луночных планшетов; биоплёнки отмечены стрелками. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

Далее была исследована зависимость ингибирующего эффекта галактана от его концентрации (рис. 20). Оказалось, что увеличение концентрации галактана в два раза, до 2 мг/мл, не усилило его способность подавлять образование биоплёнок. Уменьшение концентрации в два раза, до 0.5 мг/мл, не повлияло на способность галактана ингибировать образование биоплёнок штаммом PAO1. При этом такого количества галактана оказалось недостаточно для подавления образования биоплёнок изолятом 216. Наиболее интересным, однако, оказался эффект применения десятикратно меньшей концентрации галактана (0.1 мг/мл). Галактан в такой концентрации не только не ингибировал, но наоборот, заметно стимулировал образование биоплёнок обоими исследуемыми штаммами (рис. 20). Во всех последующих экспериментах галактан использовался в концентрации 1 мг/мл, поскольку это была наименьшая концентрация, подавляющая образование биоплёнок обоими исследуемыми штаммами.

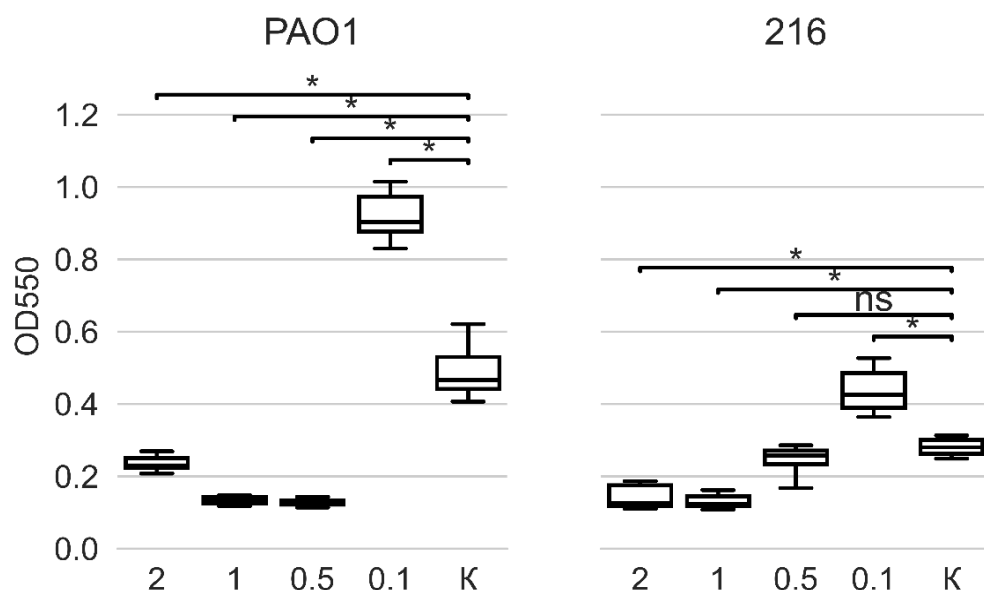


Рисунок 20. Образование биоплёнок двумя штаммами *P. aeruginosa* в присутствии разных концентраций галактана (окраска кристаллическим фиолетовым). 2 – 2 мг/мл, 1 – мг/мл, 0.5 – 0.5 мг/мл, 0.1 – 0.1 мг/мл галактана, К – контроль без добавления галактана. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

Полимерная структура галактана оказалась важна для его способности ингибировать формирование биоплёнок, поскольку галактоза в эквивалентной концентрации (1 мг/мл, 5.6 мМ) не влияла на образование биоплёнок ни одним из штаммов (рис. 21).

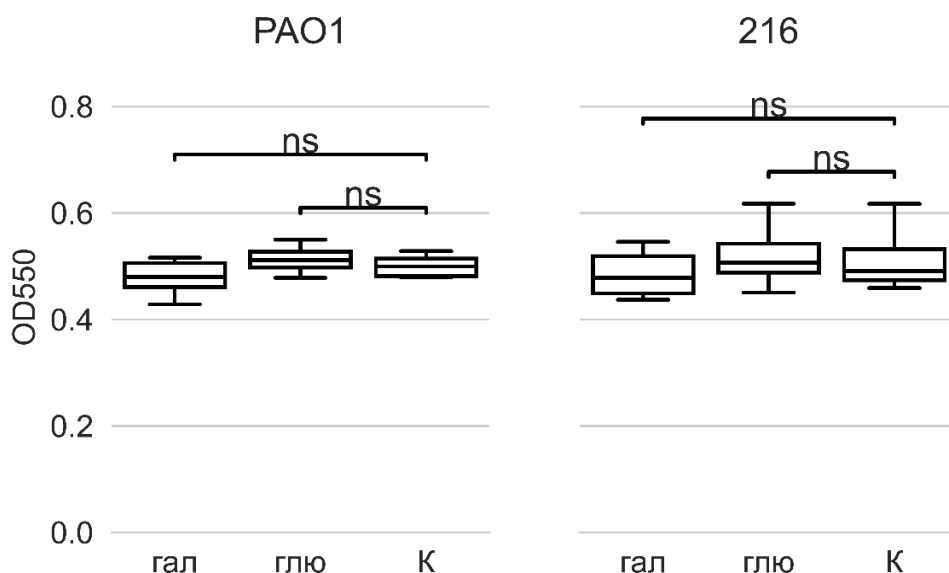


Рисунок 21. Образование биоплёнок двумя штаммами *P. aeruginosa* в присутствии моносахаридов (окраска кристаллическим фиолетовым). Гал – 1 мг/мл галактозы, глю – 1 мг/мл глюкозы, К – контроль без дополнительных моносахаридов. ns – отличия не значимы.

Галактан, как и остальные полисахариды, был приобретен в компании Megazyme Inc. Megazyme Inc. предоставляет два типа галактана картофеля: галактан и пектиновый галактан. Согласно документации, первый получается из последнего с помощью гидролиза в кислых условиях и обработки арабинофуранозидазой и отличается меньшим количеством остатков арабинозы. Как и галактан, пектиновый галактан оказался способен эффективно подавлять образование биоплёнок *P. aeruginosa* в концентрации 1 мг/мл (рис. 22).

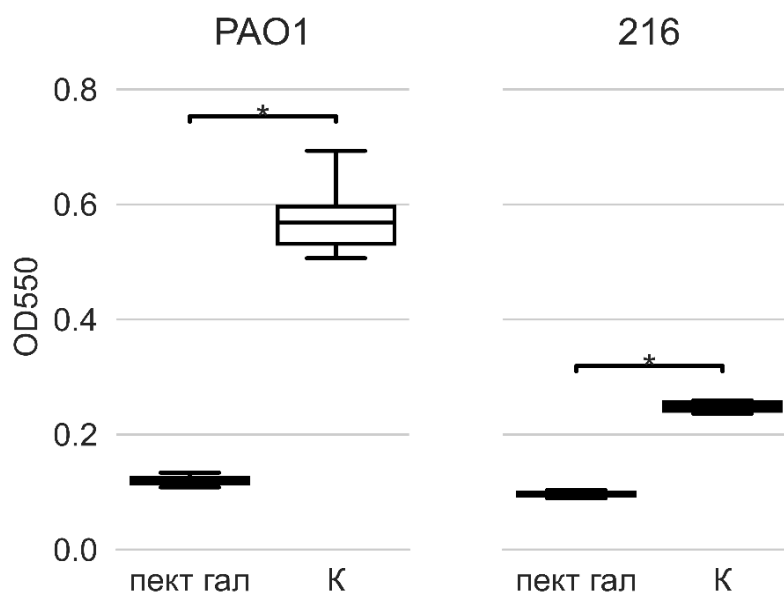


Рисунок 22. Образование биоплёнок двумя штаммами *P. aeruginosa* в присутствии пектинового галактана (окраска кристаллическим фиолетовым). Пект гал – 1 мг/мл пектинового галактана, К – контроль без полисахаридов. * - статистически значимые различия.

Затем была исследована способность галактана разрушать сформированные биоплёнки. Биоплёнки культивировались в течение суток, после чего отмывались от планктонных клеток и заново инкубировались в течение суток в свежей среде с добавлением галактана, глюкана, либо без добавления полисахаридов. В такой экспериментальной системе галактан частично разрушил биоплёнки, сформированные PAO1, и остановил дальнейший прирост биомассы биоплёнок изолята 216 (рис. 23). Глюкан не оказал выраженного действия на биоплёнки ни одного из двух штаммов (рис. 23). В опытах с разрушением биоплёнок PAO1,

сформированных в течение двух суток, были получены схожие результаты (рис. 24). В случае изолята 216 статистически значимых отличий между 48-ми часовой биоплёнкой, обработанной галактаном, и 72-х часовой биоплёнкой не наблюдалось (рис. 24).

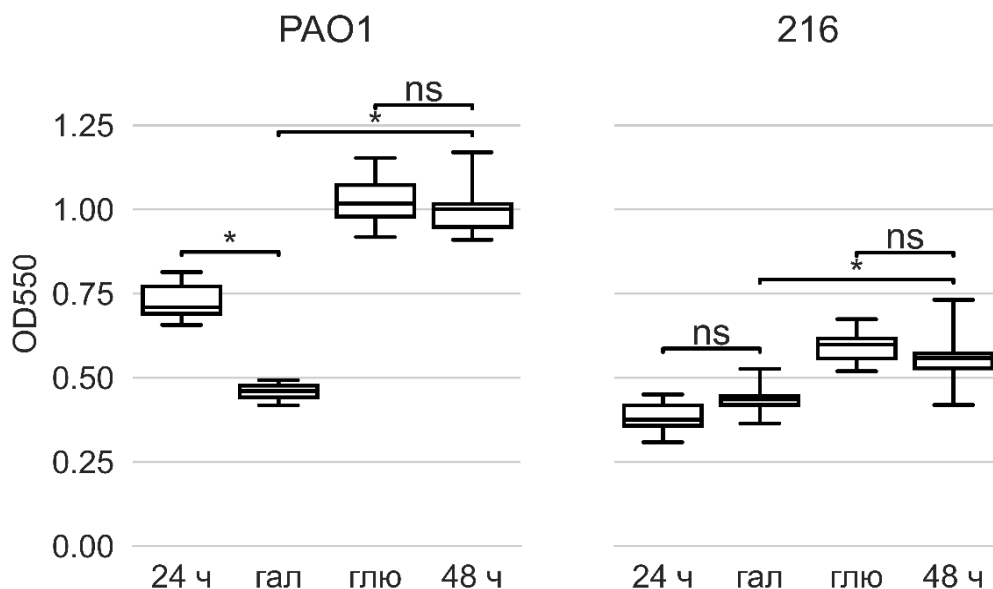


Рисунок 23. Воздействие галактана на биоплёнки двух штаммов *P. aeruginosa*, сформированные в течение 24 ч (окраска кристаллическим фиолетовым). 24 ч – контрольная биоплёнка, сформированная в течение 24 ч; гал – 24-х часовая биоплёнка, обработанная 1 мг/мл галактана в течение 24 ч; глю – 24-х часовая биоплёнка, обработанная 1 мг/мл глюконана в течение 24 ч; 48 ч – 24-х часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная в течение 24 ч без полисахаридов. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

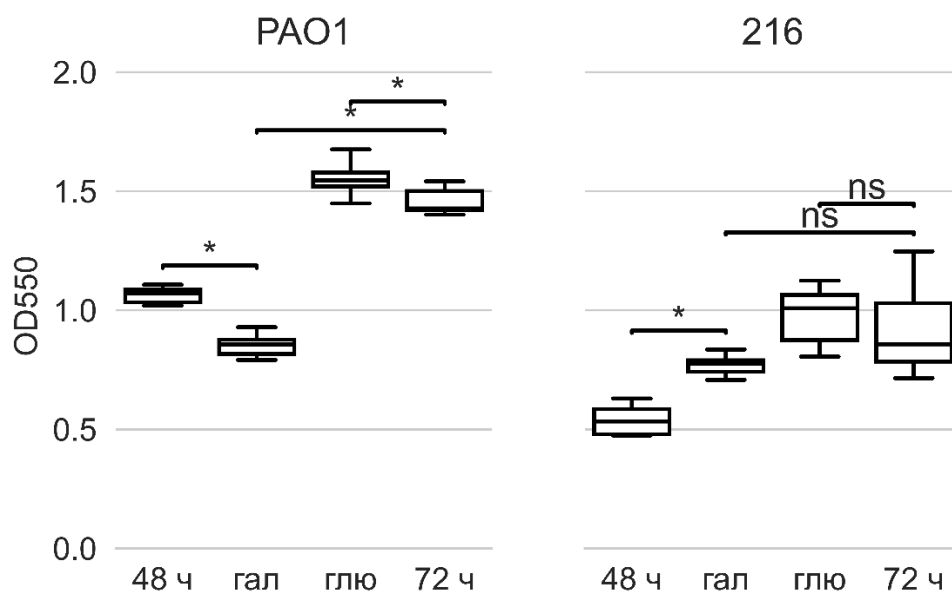


Рисунок 24. Воздействие галактана на биоплёнки двух штаммов *P. aeruginosa*, сформированные в течение 48 ч (окраска кристаллическим фиолетовым). 48 ч – контрольная биоплёнка, сформированная в течение 48 ч; гал – 48-ми часовая биоплёнка, обработанная 1 мг/мл галактана в течение 24 ч; глю – 48-ми часовая биоплёнка, обработанная 1 мг/мл глюкозана в течение 24 ч; 72 ч – 48-ми часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная в течение 24 ч без полисахаридов. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

Для того, чтобы исследовать влияние галактана на биоплёнки *P. aeruginosa* с помощью микроскопии, а также для подсчета количества жизнеспособных бактерий, был отработан метод культивации биоплёнок на полипропиленовых купонах, помещённых в лунки 96-луночных планшетов. Поскольку *P. aeruginosa* является аэробом, он прежде всего формирует биоплёнку как можно ближе к поверхности питательной среды, где доступность кислорода выше. В данной работе полипропиленовые купоны вставлялись в лунки 96-луночного планшета вертикально, таким образом предоставляя бактериям поверхность для формирования биоплёнки у верхней границы питательной среды. Этим данная методика отличается от похожих методик, где биоплёнка для визуализации культивируется на покровных стеклах на дне лунок планшета. После окраски купонов кристаллическим фиолетовым видно формирование значительного количества биоплёнки обоими штаммами, в то время как контрольный купон, инкубированный в стерильной среде без бактерий, практически не окрашен (рис. 25).

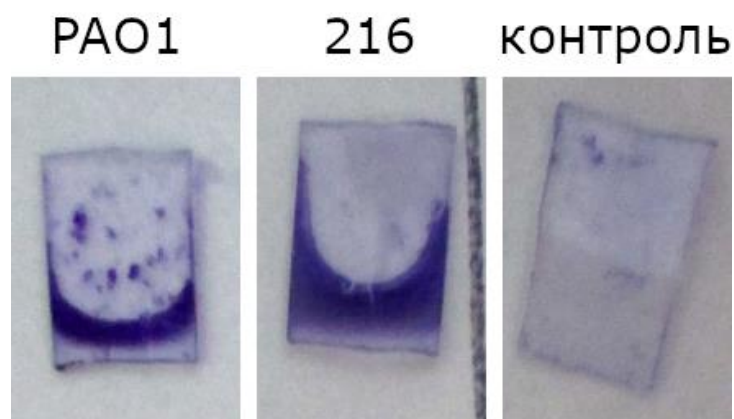


Рисунок 25. Формирование биоплёнок двумя штаммами *P. aeruginosa* на полипропиленовых купонах.

Визуальный анализ показал, что влияние галактана на формирование биоплёнок *P. aeruginosa* на полипропиленовых купонах качественно совпадает с результатами, полученными на 96-луночных планшетах (рис. 26А, рис. 27А). Культивирование биоплёнок в присутствии 1 мг/мл галактана приводит к существенному снижению количества биомассы по сравнению с контролем. Обработка сформированных биоплёнок РАО1 галактаном частично разрушает их, в то время как влияние галактана на сформированные биоплёнки изолята 216 практически не заметно.

Микроскопия биоплёнок, культивированных на полипропиленовых купонах, показала, что галактан не препятствует адгезии бактерий на полипропилене, однако предотвращает рост биоплёнки и накопление биомассы. Как видно из рис. 26-27, контрольные 24-х часовые биоплёнки как РАО1, так и изолята 216 представлены плотными скоплениями бактерий, перемежающимися с менее плотно колонизированными участками. Биоплёнки, культивированные в присутствии галактана, напротив, представляют собой практически равномерно распределённые по поверхности полипропилена бактериальные клетки либо небольшие их агрегаты. Обработка галактаном сформированных 24-х часовых биоплёнок РАО1 привела к снижению количества биомассы без принципиального изменения её морфологии: биоплёнка все так же представлена агрегатами бактерий, перемежающимися с относительно свободными от бактерий участками полипропилена, но размер

агрегатов и занимаемая ими площадь существенно меньше по сравнению с контролем. Биоплёнки изолята 216, обработанные аналогичным образом, напротив, полностью утратили свою характерную морфологию и превратились в относительно равномерный слой бактерий. Контрольная биоплёнка обоих штаммов, культивированная в течение двух суток без обработки галактаном, напоминала контрольную 24-х часовую биоплёнку, хотя отдельные морфологические элементы были трудноразличимы из-за большого количества клеток.

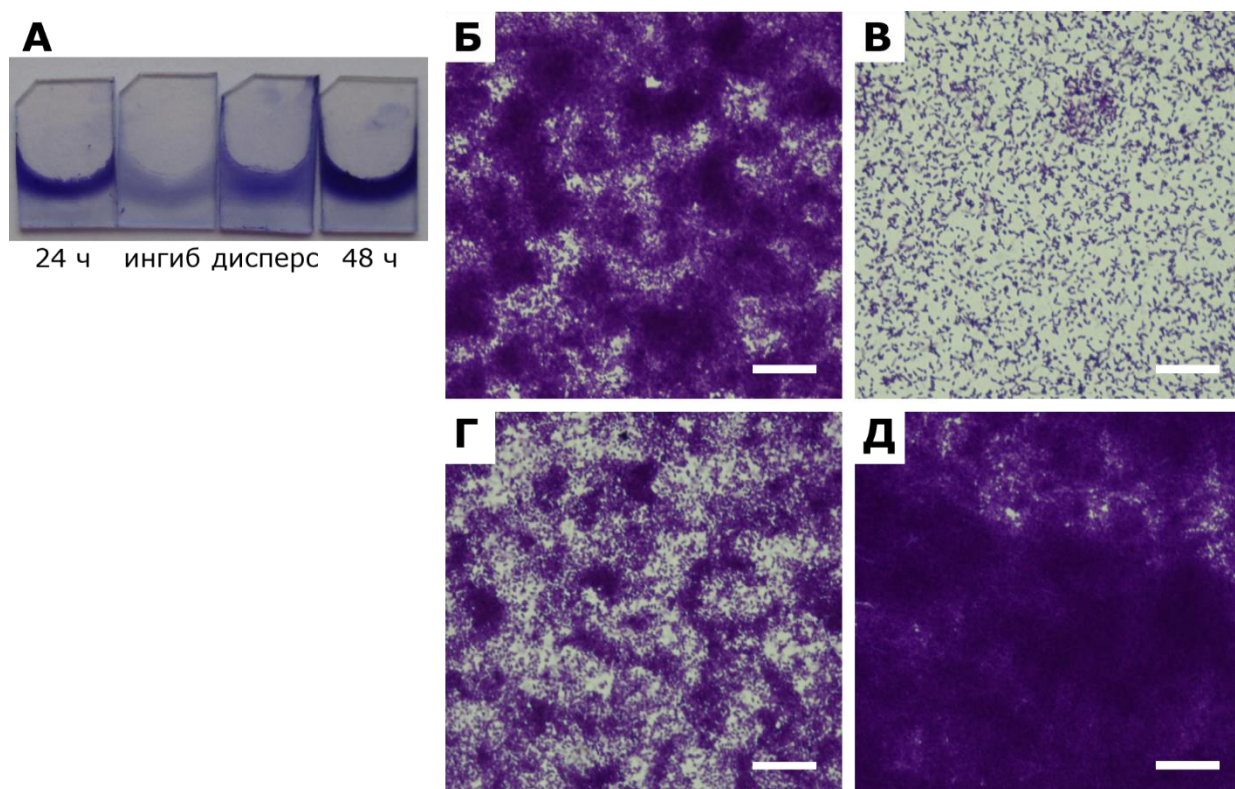


Рисунок 26. Ингибирование образования биоплёнок галактаном и воздействие галактана на сформированные биоплёнки *P. aeruginosa* PAO1 на полипропиленовых купонах. А – полипропиленовые купоны с биоплёнкой, слева направо: контрольная 24-х часовая биоплёнка, 24-х часовая биоплёнка, культивированная в присутствии 1 мг/мл галактана («ингиб»), 24-часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная 24 часа в присутствии 1 мг/мл галактана («дисперс»), контрольная 48-ми часовая биоплёнка. Б-Д – микрофотографии тех же купонов, Б – контрольная 24-х часовая биоплёнка, В – 24-х часовая биоплёнка, культивированная в присутствии 1 мг/мл галактана, Г – 24-часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная 24 часа в присутствии 1 мг/мл галактана, Д - контрольная 48-ми часовая биоплёнка. Размер линейки соответствует 25 мкм.

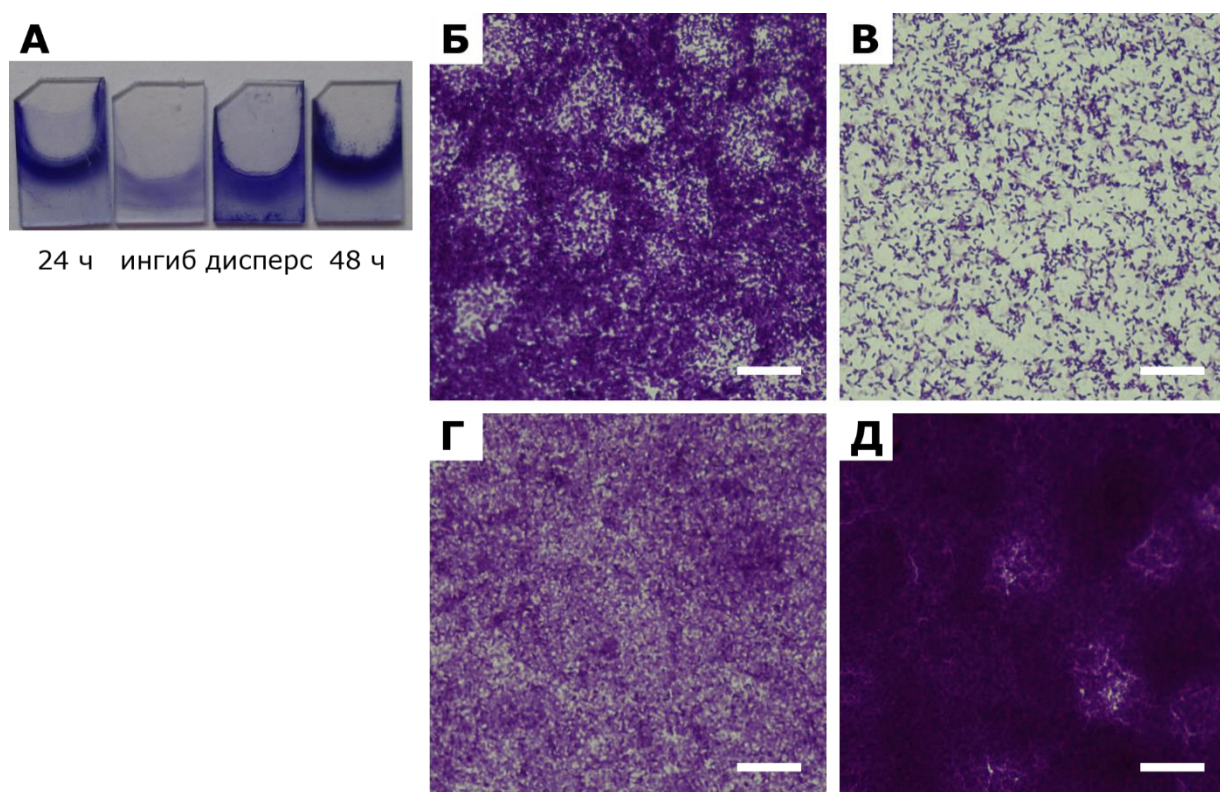


Рисунок 27. Ингибирование образования биоплёнок галактаном и воздействие галактана на сформированные биоплёнки *P. aeruginosa* 216 на полипропиленовых купонах. А – полипропиленовые купоны с биоплёнкой, слева направо: контрольная 24-х часовая биоплёнка, 24-х часовая биоплёнка, культивированная в присутствии 1 мг/мл галактана («ингиб»), 24-часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная 24 часа в присутствии 1 мг/мл галактана («дисперс»), контрольная 48-ми часовая биоплёнка. В-Д – микрофотографии тех же купонов. Б – контрольная 24-х часовая биоплёнка, В – 24-х часовая биоплёнка, культивированная в присутствии 1 мг/мл галактана, Г – 24-часовая биоплёнка, дополнительно инкубированная 24 часа в присутствии 1 мг/мл галактана, Д - контрольная 48-ми часовая биоплёнка. Размер линейки соответствует 25 мкм.

Биоплёнки, культивированные на полипропиленовых купонах, можно разрушить с помощью обработки стеклянными шариками. Подобная обработка позволяет полностью снять биоплёнку с поверхности купона (рис. 28), после чего можно определить количество жизнеспособных бактерий за счет рассеивания на твердую питательную среду.

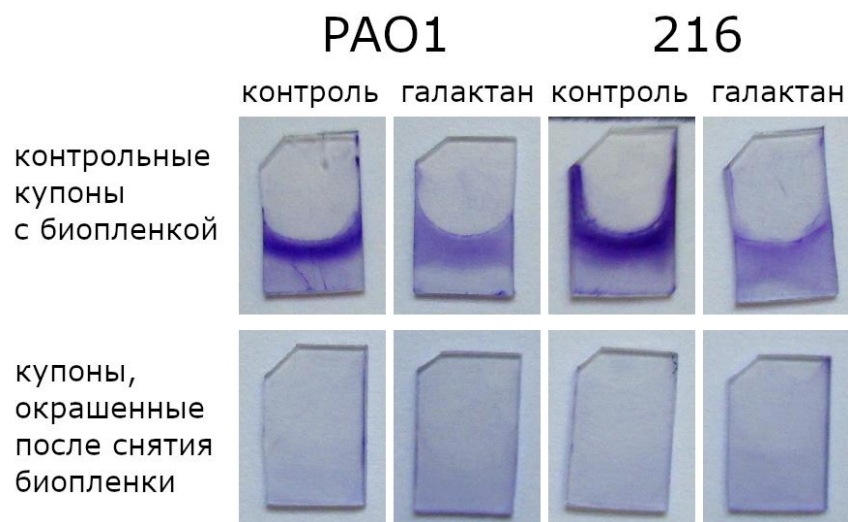


Рисунок 28. Снятие биоплёнок двух штаммов *P. aeruginosa* с полипропиленовых купонов с помощью стеклянных шариков.

Как видно из рис. 29, количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках, выращенных в присутствии 1 мг/мл галактана, существенно ниже, чем в контрольной биоплёнке (в 2-4 раза в зависимости от штамма). В соответствии с результатами, полученными в 96-луночных планшетах, обработка галактаном сформированных 24-х часовых биоплёнок РАО1, но не изолята 216 приводит к статистически значимому снижению количества бактерий. Следует отметить, что, хотя культивация биоплёнок в течение двух суток и приводит к увеличению количества бактерий по сравнению с 24-х часовыми биоплёнками, эти отличия статистически не значимы при том количестве повторностей, которое было использовано в данном эксперименте.

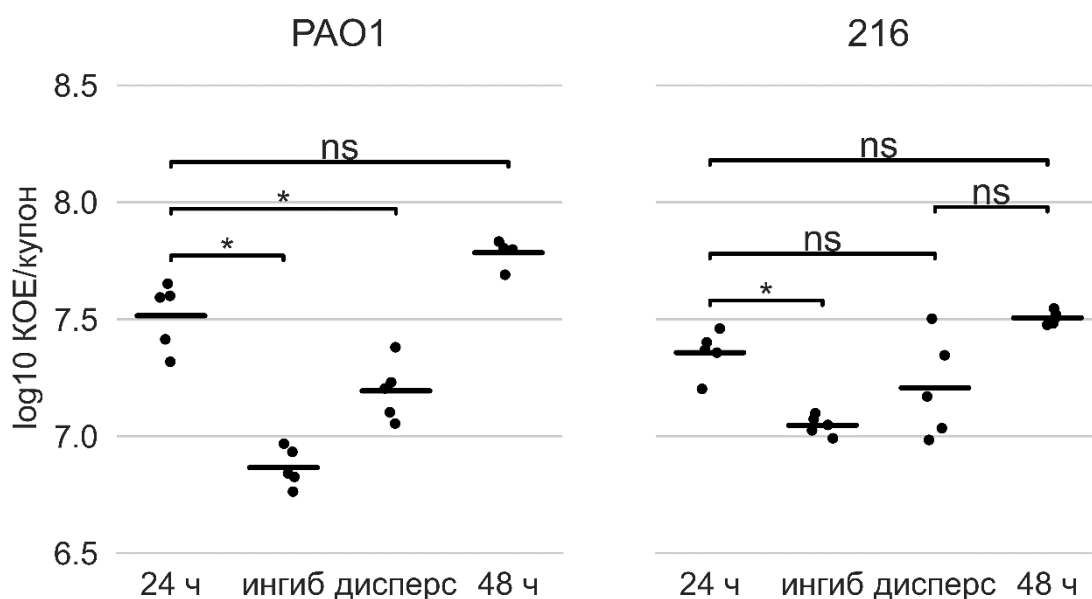


Рисунок 29. Количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках двух штаммов *P. aeruginosa*, сформированных на полипропиленовых купонах, в зависимости от обработки галактаном. 24 ч – контрольные биоплёнки, культивированные в течение 24 ч в отсутствие галактана; ингиб – биоплёнки, культивированные в присутствии 1 мг/л галактана; дисперс – биоплёнки, культивированные без галактана и дополнительно обработанные 1 мг/мл галактана в течение 24 ч; 48 ч – биоплёнки, культивированные в течение 48 часов без галактана со сменой среды через 24 ч. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

3.7 Влияние галактана на планктонный рост *P. aeruginosa*

Некоторые полисахариды, такие как хитозан, обладают бактерицидным эффектом (Li, Zhuang, 2020). Механизм действия галактана на биоплёнки также мог бы объясняться неспецифическим подавлением жизнедеятельности бактерий. Для того, чтобы проверить это предположение, было исследовано влияние галактана на скорость планктонного роста *P. aeruginosa*. Стандартные способы оценки скорости планктонного роста включают в себя измерение оптической плотности культуры и подсчет концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в процессе культивации. В данной работе были использованы оба этих подхода.

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. Контрольный полисахарид глюкоза не оказывал существенного влияния на значения оптической плотности растущей культуры *P. aeruginosa*. Наличие в среде галактана при этом приводило к существенно более быстрому росту оптической плотности по сравнению с контролем, а также к большему итоговому значению оптической плотности (рис. 30).

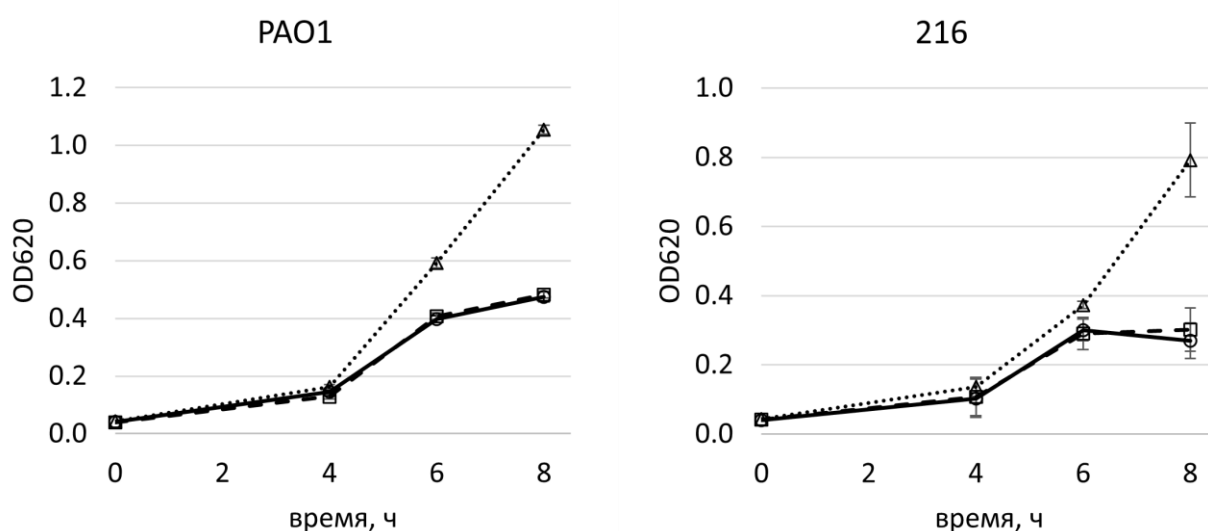


Рисунок 30. Влияние полисахаридов на оптическую плотность растущей культуры двух штаммов *P. aeruginosa*. Сплошная линия – контроль без полисахаридов, штриховая линия – 1 мг/мл глюкозы, пунктирная линия – 1 мг/мл галактана. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

Итоговая оптическая плотность культуры *P. aeruginosa* коррелировала с концентрацией галактана. На рис. 31 приведены фотографии лунок 96-луночного планшета, содержащего суспензию *P. aeruginosa*, культивируемую в присутствии разных концентраций галактана. Фотографии планшета сделаны на фоне листа бумаги с сеткой из черных линий. Линии сетки хорошо видны через лунки с контрольной суспензией, но не видны через лунки с суспензией, культивируемой в присутствии 2 мг/мл галактана (отмечено стрелками), что связано с увеличением

оптической плотности суспензии. Промежуточные концентрации галактана дают промежуточную оптическую плотность.

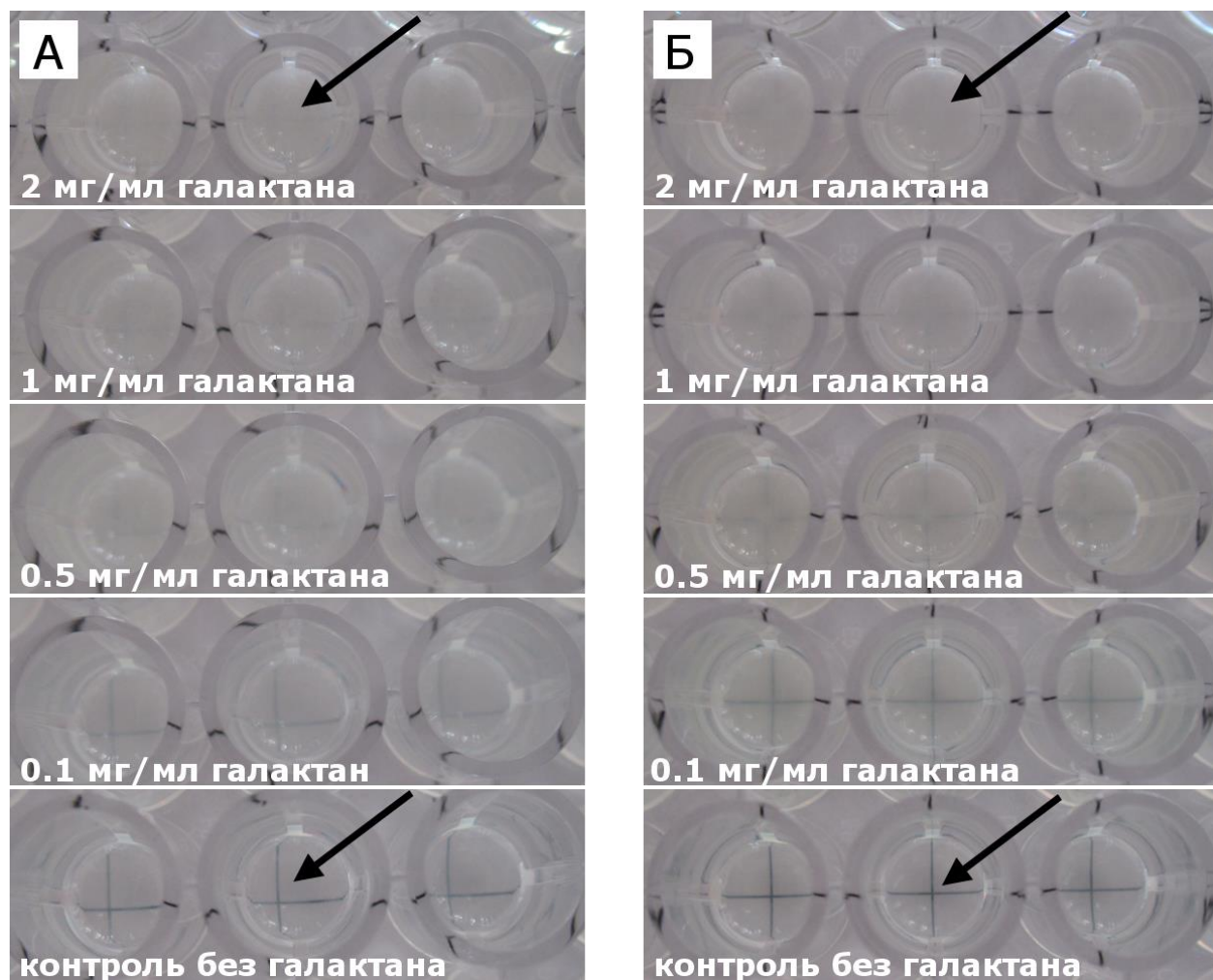


Рисунок 31. Фотографии бактериальной суспензии двух штаммов *P. aeruginosa* в лунках 96-луночного планшета после культивации в течение суток в присутствии разных концентраций галактана. А – PAO1, Б – 216. Для фотографирования под планшет был помещен лист бумаги с напечатанными пересекающимися черными линиями. Стрелками отмечены места пересечения черных линий для лунок с наибольшей (вверху) и наименьшей (внизу) мутностью.

В противоположность результатам, полученным при измерении оптической плотности, подсчет КОЕ/мл не показал существенной разницы в скорости планктонного роста между вариантами с галактаном, глюкозамом и без добавления полисахаридов (рис. 32).

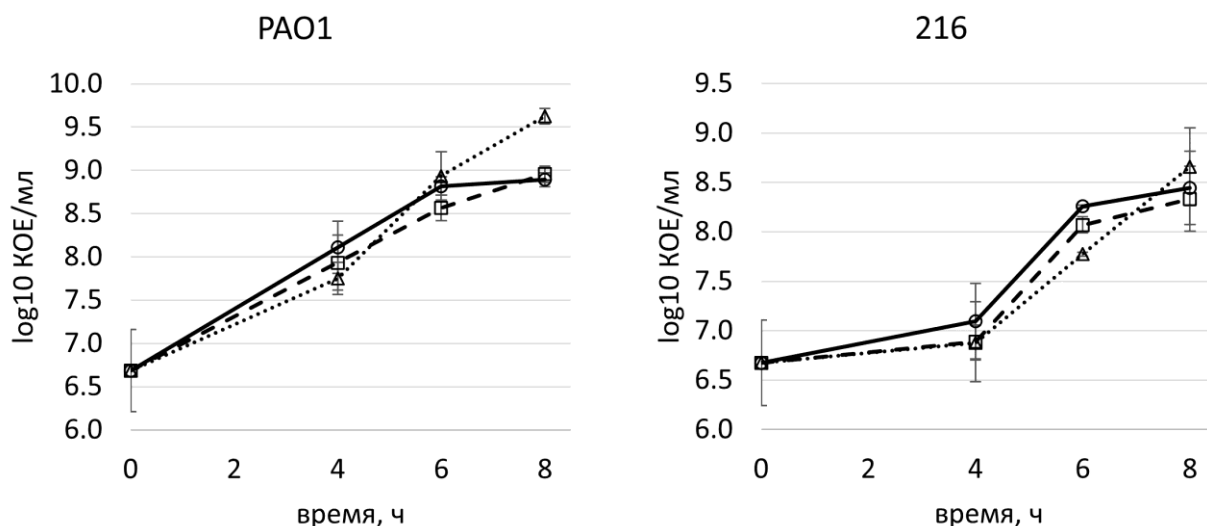


Рисунок 32. Влияние полисахаридов на количество КОЕ/мл в растущей культуре двух штаммов *P. aeruginosa*. Сплошная линия – контроль без полисахаридов, штриховая линия – 1 мг/мл глюкоза, пунктирная линия – 1 мг/мл галактана. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

По всей видимости, увеличение оптической плотности при культивации *P. aeruginosa* в присутствии галактана объясняется не увеличением концентрации бактериальных клеток, а какими-то иными причинами. Такой причиной, вероятно, может быть агрегация бактериальных клеток под действием галактана. В частности, было замечено наличие видимых невооружённым глазом слизистых агрегатов при культивации *P. aeruginosa* в присутствии галактана в течение 24-х часов. Эти агрегаты отсутствовали в контрольных образцах и в образцах, в которые был добавлен глюкоза. Кроме того, после кратковременного вортексирования суспензии бактерий оптическая плотность как контрольной суспензии, так и суспензии, культивированной в присутствии галактана, снижается и оказывается практически одинаковой (таблица 4). Можно предположить, что это связано с разрушением бактериальных агрегатов при вортексировании.

Таблица 4. Оптическая плотность суспензии клеток PAO1, культивированной в течение 5 часов при 37°C и 400 об./мин в присутствии 1 мг/мл галактана или в отсутствии полисахаридов до и после кратковременного вортексирования.

Вариант	OD620 до вортексирования	OD620 после вортексирования
PAO1	0.149	0.072
PAO1 + галактан	0.298	0.059

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. Таким образом, его действие на биоплёнки объясняется другими причинами.

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

Поскольку галактан эффективно ингибировал образование биоплёнок *P. aeruginosa*, а также оказывал заметный эффект на сформированные биоплёнки, следующим шагом было изучение совместного действия галактана и антибиотиков на биоплёнки *P. aeruginosa*. Для этой работы было выбрано три антибиотика, принадлежащих к разным классам и действующим на разные бактериальные мишени: цефтазидим – цефалоспорин 3-го поколения, ингибирующий синтез пептидогликана клеточной стенки; ципрофлоксацин – фторхинолон, ингибирующий ферменты гиразу и топоизомеразу IV и нарушающий процесс репликации ДНК, и амикацин – аминогликозид, ингибирующий бактериальную рибосому и подавляющий синтез белка. Все три выбранных антибиотика используются в клинической практике для лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

Вначале для трёх антибиотиков были определены значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК). Для учета влияния микробной нагрузки на значения МИК и МБК (т.н. эффект инокулюма, “inoculum effect”), МИК и МБК были определены как для стартовой

концентрации бактерий 5×10^5 КОЕ/мл, являющейся стандартом при определении МИК, так и для стартовой концентрации $3-4 \times 10^7$ КОЕ/мл, использованной в данной работе при культивации биоплёнок. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5. Значения МИК и МБК цефтазида (цеф), ципрофлоксацина (цип) и амикацина (ами) для двух штаммов *P. aeruginosa* в среде М63.

Штамм и плотность засева, КОЕ/мл	МИК, мкг/мл			МБК, мкг/мл		
	цеф	цип	ами	цеф	цип	ами
РАО1, 5×10^5	2	0.125	32	4	0.25	64
РАО1, 5×10^7	>16	0.125	64	>16	0.25	256
216, 5×10^5	1	0.5	32	2	1	64
216, 5×10^7	2	0.5	64	2	1	256

Как видно из таблицы 5, штамм РАО1 при более высокой стартовой концентрации бактерий оказался устойчив к цефтазидиму (МИК > 16 мкг/мл), в то время как в стандартных условиях МИК цефтазида для РАО1 равнялась 2 мкг/мл. Наличие эффекта инокулюма для комбинации РАО1/цефтазидим подтверждается литературными данными (Vulitta *et al.*, 2009). Цефтазидим не использовался в экспериментах с биоплёнками РАО1, поскольку отличить специфическую устойчивость биоплёнки от эффекта инокулюма не представляется возможным. МИК цефтазида для изолята 216 практически не зависела от стартовой концентрации бактерий. Также не зависела от стартовой концентрации бактерий чувствительность обоих штаммов к ципрофлоксацину. Влияние стартовой концентрации бактерий на МИК и МБК амикацина минимально. Необходимо отметить, что оба штамма характеризуются очень высокими значениями МИК амикацина, и могли бы быть

классифицированы как устойчивые. Это, однако, связано с эффектом использованной питательной среды (М63), поскольку тестирование дисковым методом на агаре Мюллер-Хинтона показало, что оба штамма чувствительны к данному антибиотику.

Далее были определены минимальные концентрации антибиотиков, необходимые для эрадикации биоплёнки (МКЭБ, минимальная концентрация эрадикации биоплёнок). МКЭБ определяется с помощью культивирования биоплёнки в течение какого-то времени, обработки сформированной биоплёнки антибиотиком, отмывки от антибиотика и определения жизнеспособности бактерий в биоплёнке. В данной работе МКЭБ определялся в двух экспериментальных системах: в использованной выше модели с культивацией биоплёнки на стенках лунок 96-луночного планшета и с помощью Calgary Biofilm Device (далее CBD). CBD представляет собой специальную крышку для 96-луночных планшетов, снабжённую пластиковыми колышками. При закрытии планшета такой крышкой колышки оказываются погружены в лунки планшета, что позволяет бактериям формировать биоплёнку на их поверхности. Такая конструкция позволяет легко переносить биоплёнку на колышках между планшетами, содержащими разные среды или растворы антибиотиков. Для определения жизнеспособности биоплёнок, обработанных антибиотиками, такие биоплёнки отмывались от антибиотиков и помещались в свежую питательную среду. Отсутствие бактериального роста после инкубации биоплёнок в свежей питательной среде трактовалось как их эрадикация.

Цефтазидим и ципрофлоксацин оказались не способны полностью подавить жизнеспособность биоплёнки даже в максимальной использованной концентрации (128*МИК). В то же время амикацин приводил к эрадикации биоплёнок обоих штаммов в концентрациях 128-512 мкг/мл в зависимости от экспериментальной системы (таблица 6). Таким образом, МКЭБ амикацина оказались примерно равны его МБК. По сравнению с планктонными клетками биоплёнки оказались существенно более устойчивыми к цефтазидиму и ципрофлоксацину, но не к амикацину.

Таблица 6. Минимальные концентрации антибиотиков, необходимые для эрадикации биоплёнки (МКЭБ) для цефтазидима (цеф), ципрофлоксацина (цип) и амикацина (ами) в отношении контрольных биоплёнок двух штаммов *P. aeruginosa* и биоплёнок, культивированных в присутствии галактана.

Штамм	МКЭБ, мкг/мл		
	цеф	цип	ами
РАО1	>256	>32	128 (планшет); 256 (CBD)
216	>256	>128	256 (планшет); 512 (CBD)

Чтобы проверить влияние галактана на чувствительность биоплёнок к антибиотикам, было проведено два типа экспериментов. В одних экспериментах определялись МКЭБ антибиотиков при их одновременном применении с 1 мг/мл галактана. В других экспериментах биоплёнка предварительно культивировалась в присутствии галактана, после чего определялись МКЭБ такой «ингибированной» биоплёнки. Однако ни совместное применение антибиотиков и галактана, ни обработка антибиотиками «ингибированной» биоплёнки не привели к изменению значений МКЭБ ни одного из антибиотиков в отношении ни одного из штаммов.

Хотя оказалось, что галактан не влияет на МКЭБ ни одного из протестированных антибиотиков, было предположено, что он тем не менее может способствовать снижению количества жизнеспособных бактерий в биоплёнке при его совместном применении с антибиотиками по сравнению с применением только антибиотиков. Для того, чтобы проверить это предположение, биоплёнки *P. aeruginosa* культивировались на полипропиленовых купонах в присутствии или отсутствии 1 мг/мл галактана, после чего обрабатывались антибиотиками либо антибиотиками в сочетании с 1 мг/мл галактана. После обработки биоплёнки снимались с купонов с помощью стеклянных шариков и количество жизнеспособных бактерий определялось посевом на агаризованную питательную среду. Антибиотики цефтазидим и ципрофлоксацин использовались в концентрациях 4*МБК, амикацин – в концентрации 256 мкг/мл. При обработке планктонных культур этими

концентрациями антибиотиков все бактериальные клетки уничтожаются. Результаты этого опыта представлены на рис. 33-34.

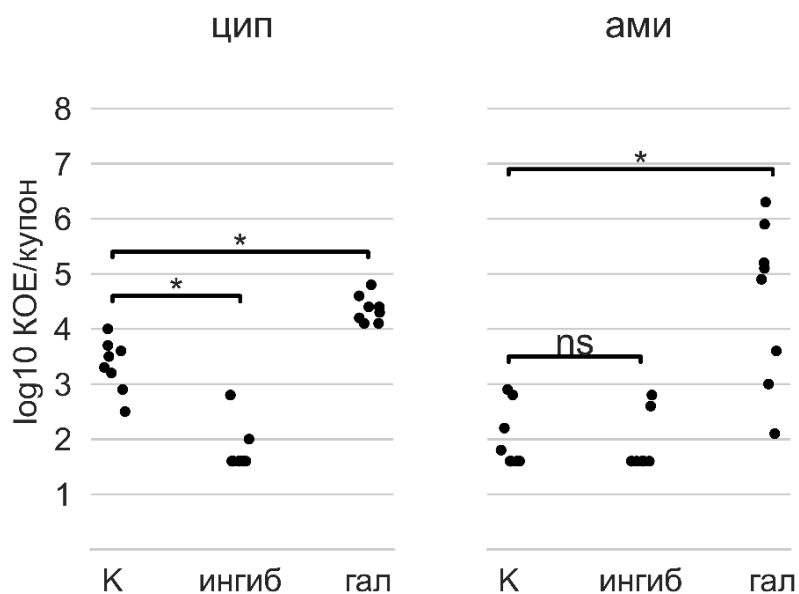


Рисунок 33. Количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках *P. aeruginosa* PAO1 после обработки антибиотиками или антибиотиками с галактаном. Цип – 4*МБК ципрофлоксацина, ами – 256 мкг/мл амикацина; К – контрольные биоплёнки, культивированные в течение 24 ч и обработанные антибиотиком в течение ещё 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. На рисунке представлены суммарные данные из двух независимых экспериментов. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

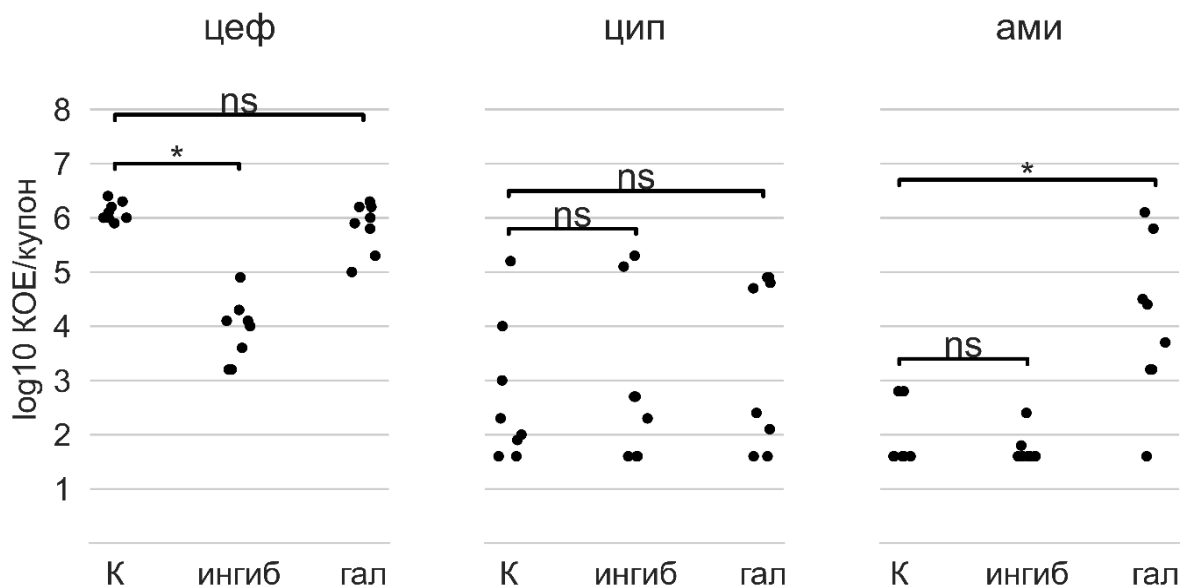


Рисунок 34. Количество жизнеспособных бактерий в биоплёнках *P. aeruginosa* 216 после обработки антибиотиками или антибиотиками с галактаном. Цеф – 4*МБК цефтазидима, цип – 4*МБК ципрофлоксацина, ами – 256 мкг/мл амикацина; ктрл – контрольные биоплёнки, культивированные в течение 24 ч и обработанные 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. На рисунке представлены суммарные данные из двух независимых экспериментов. * - статистически значимые различия, ns – отличия не значимы.

В случае таких комбинаций штамм/антибиотик, как PAO1/ципрофлоксацин и 216/цефтазидим, биоплёнки, культивированные в присутствии галактана («ингибированные» биоплёнки) действительно оказались более чувствительны к действию антибиотиков. Количество жизнеспособных бактерий в контрольных биоплёнках оказалось в среднем более чем в 30 и 160 раз больше, чем в «ингибированных» биоплёнках, для комбинаций PAO1/ципрофлоксацин и 216/цефтазидим соответственно. Эта разница существенно больше, чем разница в количестве бактерий в контрольной и «ингибированной» биоплёнках до применения антибиотиков. В случае с амикацином как контрольные, так и «ингибированные» биоплёнки обоих штаммов почти никогда не содержали достаточного количества жизнеспособных бактерий для того, чтобы их можно было обнаружить данным методом. В связи с этим невозможно сказать, были ли «ингибированные» биоплёнки

более чувствительны к амикацину. Обработка биоплёнок изолята 216 ципрофлоксацином дала нестабильный результат, который трудно интерпретировать.

При совместном применении галактана и антибиотиков наблюдалась обратная картина: галактан либо не оказывал заметного влияния на чувствительность биоплёнок к антибиотикам, как в случае комбинации 216/цефтазидим, либо способствовал увеличению количества жизнеспособных бактерий в биоплёнках по сравнению с применением только антибиотиков. Такая картина наблюдалась для комбинации PAO1/ципрофлоксацин, а также для обоих штаммов и амикацина. Наиболее выраженным этот эффект был именно в случае с амикацином, где применение антибиотика вместе с галактаном позволяло обнаружить до 10^6 КОЕ/купон, в то время как обработка биоплёнок амикацином без галактана как правило снижала количество жизнеспособных бактерий ниже порога обнаружения.

Подобные результаты могут быть объяснены двумя способами. С одной стороны, галактан может каким-то образом защищать бактерии от действия антибиотиков. С другой стороны, часть бактерий под воздействием антибиотика может переходить в некультивируемое состояние, благодаря чему они не обнаруживаются при пересеве на агаризованную среду. В таком случае действие галактана может заключаться в предотвращении перехода бактерий в некультивируемое состояние. Чтобы понять, какое из этих возможных объяснений больше соответствует действительности, биоплёнки PAO1, культивированные на полипропиленовых купонах, были обработаны амикацином и исследованы под флуоресцентным микроскопом с окраской красителями LIVE/DEAD. При окраске красителями LIVE/DEAD живые клетки с интактной мембраной окрашиваются зелёным, в то время как мертвые клетки с повреждённой мембраной, а также внеклеточная ДНК окрашиваются красным. Как видно на рис. 35, после обработки амикацином в сочетании с галактаном значительно большее количество бактерий в биоплёнке сохраняют интактные мембраны и могут считаться жизнеспособными по сравнению с биоплёнкой, обработанной только амикацином. Таким образом, вероятнее всего, галактан каким-то образом предотвращает гибель бактерий. При этом необходимо отметить, что даже в биоплёнке, обработанной только амикацином, сохраняется заметное количество жизнеспособных бактерий, которые не

обнаруживаются при снятии биоплёнки с купона и посева на агаризованную среду. По-видимому, часть бактерий все же переходит в некультивируемое состояние, что также подтверждается результатами, приведёнными ниже.

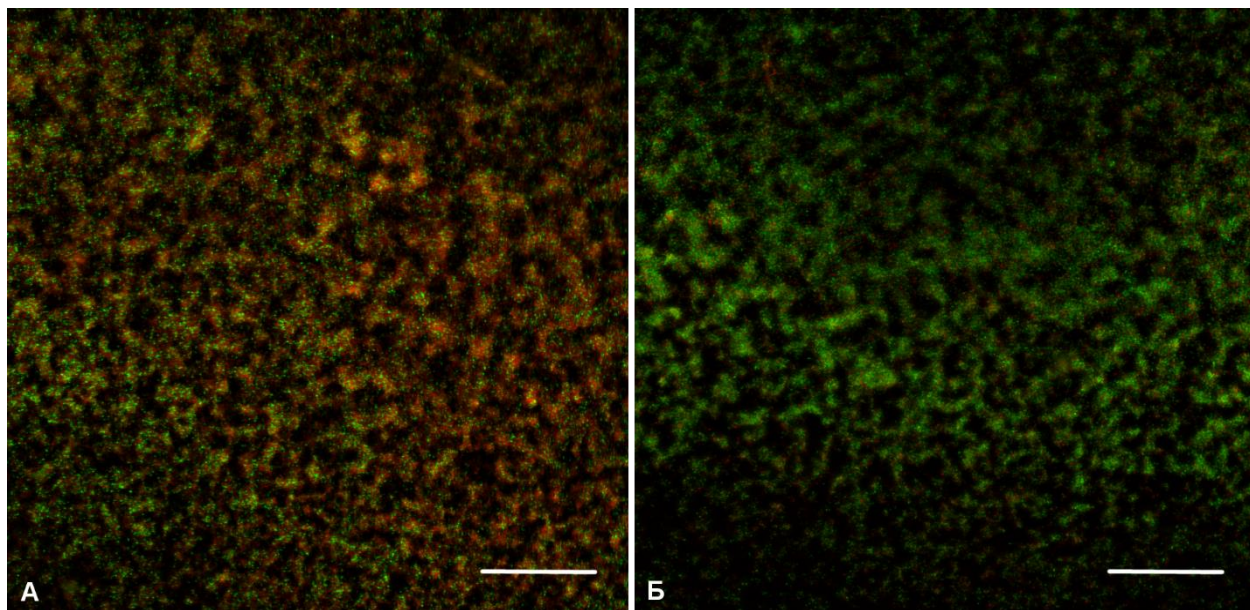


Рисунок 35. Биоплёнка *P. aeruginosa* PAO1, обработанная 256 мкг/мл амикацина (А) или 256 мкг/мл амикацина с 1 мг/мл галактана (Б), окрашенная красителями LIVE/DEAD и визуализированная с помощью флуоресцентной микроскопии. Размер линейки соответствует 100 мкм.

Интересно, что галактан не оказывает подобного защитного влияния на планктонные клетки. После инкубации планктонных клеток с антибиотиками в аналогичных концентрациях жизнеспособные бактерии не обнаруживаются вне зависимости от добавления галактана.

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

В описанных выше экспериментах МКЭБ амикацина для PAO1 оказалась равна 256 мкг/мл. Иначе говоря, после обработки такой концентрацией амикацина, биоплёнка PAO1 не дает бактериального роста при помещении в питательную среду без антибиотиков. При этом результаты флуоресцентной микроскопии показывают наличие существенного количества живых бактерий в биоплёнках PAO1 после обработки амикацином (см. рис. 35А). Кроме того, было замечено, что, если в

микроцентрифужные пробирки, в которых проводилось снятие биоплёнки (см. Материалы и Методы), добавить свежую питательную среду Nutrient Broth (эта же среда использовалась при определении МКЭБ), это приводит к возобновлению бактериального роста. По-видимому, после обработки амикацином внутри биоплёнок остаются живые бактерии, которые, однако, находятся в дормантном или некультивируемом состоянии (Liu *et al.*, 2023). При этом либо PBS, используемый при разрушении биоплёнки, либо разрушение биоплёнки само по себе провоцирует выход этих бактерий из дормантного состояния. Чтобы проверить эту гипотезу, биоплёнки PAO1, обработанные амикацином, были 1) без разрушения инкубированы либо в PBS с добавлением Nutrient Broth, либо в среде M63 и 2) разрушены в среде Nutrient Broth без добавления PBS. Оказалось, что оба варианта способствуют возобновлению роста дормантных бактерий. Таким образом, по-видимому, амикацин частично вызывает переход бактерий в биоплёнках в дормантное состояние, из которого их можно вывести инкубацией в среде с достаточным количеством фосфатов (M63, PBS+Nutrient Broth), либо разрушением биоплёнки и высвобождением этих бактерий. Интересно, что, когда обработанные амикацином биоплёнки без разрушения инкубировались в среде Nutrient Broth с добавлением 0.1% галактана, это также приводило к возобновлению бактериального роста. По-видимому, нарушение структуры биоплёнки за счет её взаимодействия с галактаном действует на дормантные клетки так же, как и её физическое разрушение.

3.10 Действие галактана на биоплёнки других видов

Далее была изучена способность галактана подавлять образование биоплёнок двумя другими патогенными видами бактерий, вызывающими оппортунистические инфекции: *Stenotrophomonas maltophilia* и *B. cenocepacia*. Эти виды были выбраны в связи с тем, что, как и *P. aeruginosa*, они являются подвижными аэробными грамотрицательными бактериями, и, следовательно, могут иметь общие черты в строении и формировании биоплёнок. Биоплёнки *S. maltophilia* культивировались в среде M63 добавлением глюкозы и казаминовых кислот аналогично *P. aeruginosa*. Биоплёнки *B. cenocepacia* культивировались в среде LB, поскольку использованный штамм не образовывал биоплёнку в среде M63. Галактан в концентрации 0.1%

изменял морфологию биоплёнки *S. maltophilia*, образованную на стенках лунок 96-луночных планшетов, и немного, хотя и статистически значимо снижал количество биомассы в биоплёнке (рис. 36).

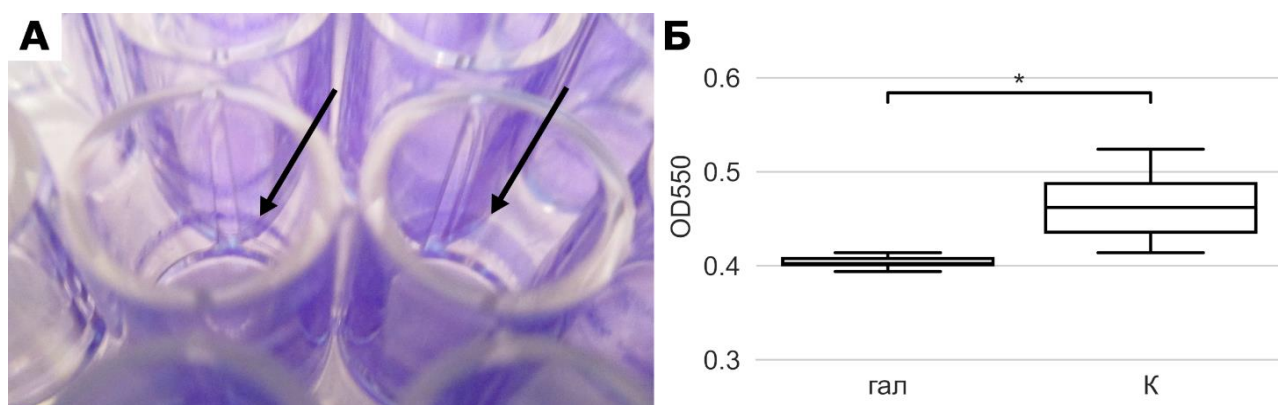


Рисунок 36. Влияние галактана на образование биоплёнок *S. maltophilia* в 96-луночных планшетах. А – фотографии биоплёнок, образованных в лунках планшета, слева – биоплёнка, сформировавшаяся в присутствии 1 мг/мл галактана, справа – контрольная биоплёнка; биоплёнки отмечены стрелками. Б – окраска кристаллическим фиолетовым; гал – 1 мг/мл галактана, К – контроль без полисахаридов. * - статистически значимые различия.

На биоплёнки *B. ceposerasia* галактан оказывал обратный эффект, увеличивая количество биомассы. Этот эффект, однако, был выражен слабо (рис. 37).

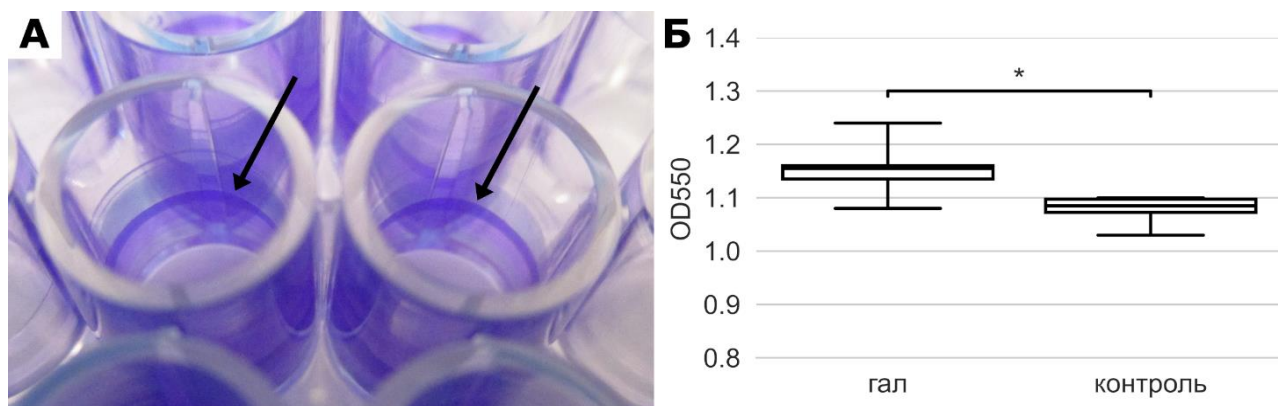


Рисунок 37. Влияние галактана на образование биоплёнок *B. ceposerasia* в 96-луночных планшетах. А – фотографии биоплёнок, образованных в лунках планшета, слева – биоплёнка, сформировавшаяся в присутствии 1 мг/мл галактана, справа – контрольная биоплёнка; биоплёнки отмечены стрелками. Б – окраска кристаллическим фиолетовым; гал – 1 мг/мл галактана, контроль – контроль без полисахаридов. * - статистически значимые различия.

3.11 Клонирование, наработка и выделение лизостафина, дисперсина и химерного белка Lst-DspB

Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих лизостафин и дисперсин, были оптимизированы с использованием оптимальных кодонов для экспрессии в *E. coli*, а также с учетом минимизации вторичной структуры мРНК. Кроме того, последовательности генов лизостафина и дисперсина были фланкированы сайтами рестрикции BamHI и BglII. Ген Lst-DspB получен с помощью слияния генов лизостафина, дисперсина и короткого глицин-серинового спейсера с использованием стандартных генно-инженерных подходов.

Гены были синтезированы, клонированы в экспрессионные вектора и трансформированы в клетки *E. coli* с получением соответствующих штаммов продуцентов. Нарботанные рекомбинантные белки были очищены с помощью катионообменной (лизостафин, Lst-DspB) и металл-хелатной хроматографии (дисперсин).

3.12 Пептидазная активность лизостафина и Lst-DspB

Лизостафин катализирует реакцию расщепления пентаглициновых пептидных мостиков в пептидогликане *S. aureus*. Для того, чтобы проверить, насколько слияние лизостафина с дисперсином повлияло на каталитическую активность получившегося химерного белка Lst-DspB, была исследована способность лизостафина и Lst-DspB гидролизовать изолированный пентаглициновый пептид. Для этого пептид инкубировался в течение 30 часов в присутствии одинаковых молярных концентраций лизостафина и Lst-DspB, и степень его гидролиза определялась спектрофотометрически после реакции свободных аминогрупп с нингидрином (рис. 38).

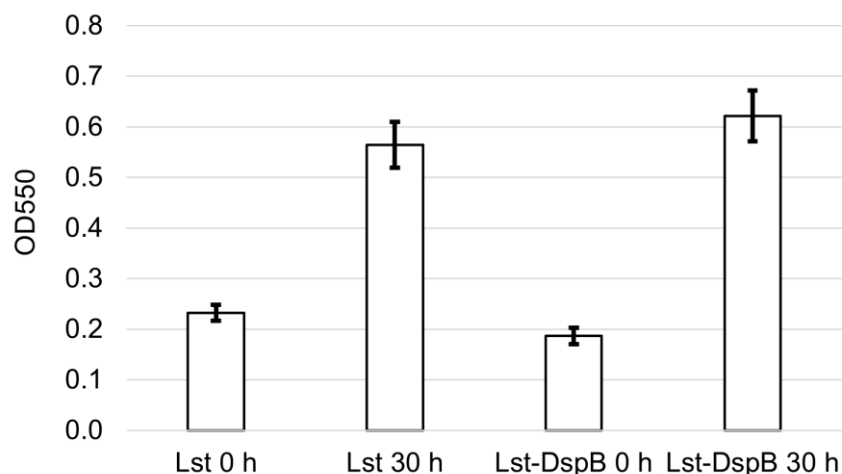


Рисунок 38. Протеолитическая активность лизостафина и Lst-DspB в отношении пентаглицина.

Как видно из рис. 38, способность Lst-DspB гидролизовать пентаглициновый пептид не отличалась от таковой для лизостафина. Таким образом, слияние с дисперсином не повлияло на каталитическую активность Lst-DspB.

3.13 Гликозидгидролазная активность дисперсина и Lst-DspB

Дисперсин расщепляет β -1,6 гликозидные связи в PNAG. Для того, чтобы проверить, влияет ли слияние с лизостафином на гликозидгидролазную активность Lst-DspB, была изучена способность дисперсина и Lst-DspB гидролизовать синтетический аналог субстрата дисперсина – *p*-нитрофенил N-ацетил- β -D-глюкозаминид. Эквимолярные концентрации дисперсина или Lst-DspB инкубировались с *p*-нитрофенил N-ацетил- β -D-глюкозаминидом в течение 1 часа, и количество высвобожденного *p*-нитрофенола определялось спектрофотометрически (Рис. 39).

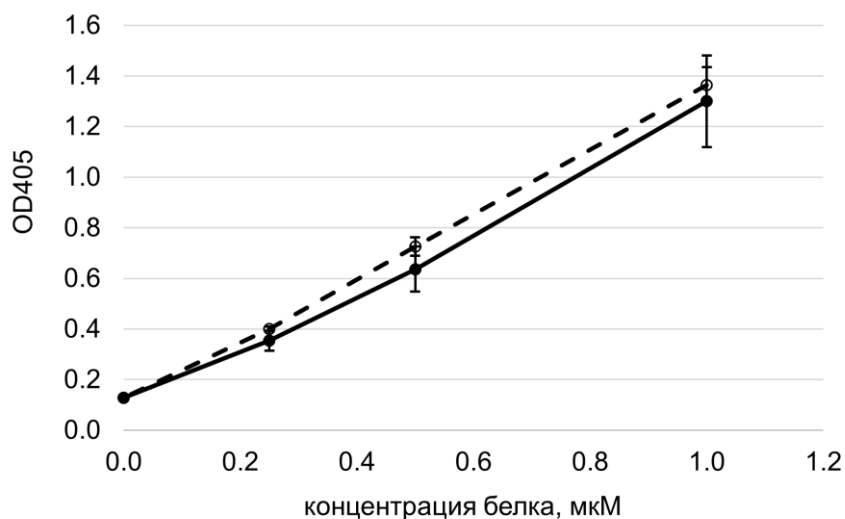


Рисунок 39. Расщепление *p*-нитрофенил N-ацетил- β -D-глюкозаминида разными концентрациями дисперсина (сплошная линия) и Lst-DspB (пунктирная линия).

Каталитическая эффективность (k_{cat}) дисперсина и химерного белка Lst-DspB в отношении *p*-нитрофенил N-ацетил- β -D-глюкозаминида составила 0.026 ± 0.005 и $0.030 \pm 0.002 \text{ с}^{-1}$, соответственно, эти различия не были статистически значимы. Таким образом, каталитическая активность как лизостафина, так и дисперсина, сохраняется при их слиянии в химерный белок Lst-DspB.

3.14 Бактериолитическая активность лизостафина и Lst-DspB

Пептидогликан бактериальной клеточной стенки представляет собой сложную полимерную структуру, в которой полисахаридные цепочки перешиты пептидными мостиками. В связи с этим действие лизостафина и Lst-DspB на бактериальные клетки может отличаться, даже несмотря на то, что их каталитическая активность идентична. В частности, существенно больший размер Lst-DspB может препятствовать его связыванию с пептидогликаном, проникновению в поры между полисахаридными цепочками и пептидными мостиками, и снижать доступность более глубоких слоев пептидогликана для гидролиза Lst-DspB. Подобный эффект ранее уже наблюдался для химерного белка, состоящего из лизостафина и альбумин-связывающего домена (Grishin *et al.*, 2019). Для сравнения бактериолитической активности лизостафина и Lst-DspB была изучена скорость просветления суспензии бактериальных клеток под действием разных концентраций этих белков. Для этого бактериальная суспензия

смешивается с исследуемыми белками, и оптическая плотность суспензии измеряется через определённые промежутки времени. Лизис бактериальных клеток под действием исследуемых белков приводит к тому, что они перестают рассеивать свет и мутность суспензии снижается.

Скорость просветления бактериальной суспензии, равная 0.01 единиц оптической плотности в минуту, достигалась при концентрации лизоцифаина 12.5 нМ. При этом для достижения такой же бактериолитической активности требовалось 171.7 нМ Lst-DspB, что в 13.7 раз больше (рис. 40).

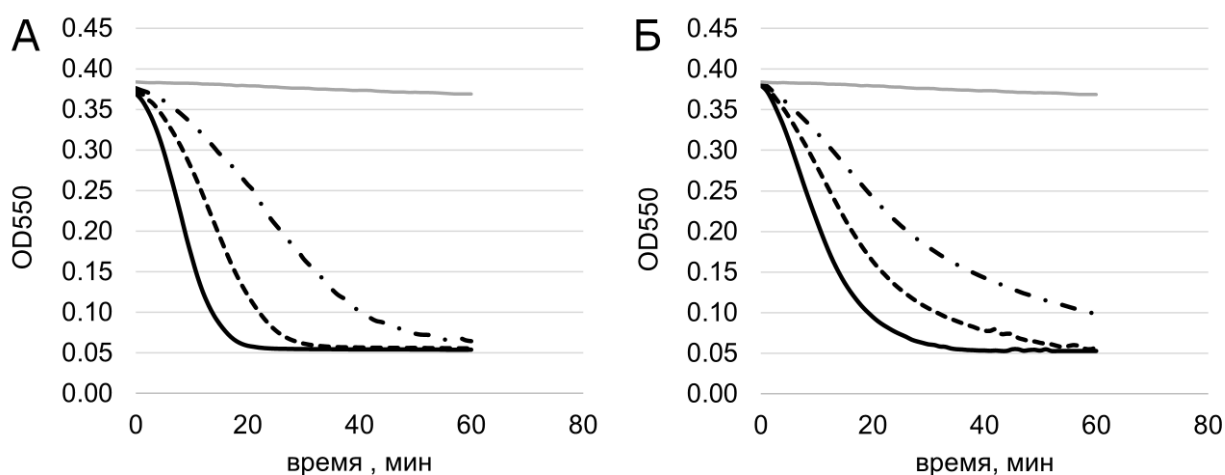


Рисунок 40. Просветление суспензии клеток *S. aureus* ATCC 29213 под действием разных концентраций лизоцифаина (А) и Lst-DspB (Б). Для лизоцифаина сплошная черная линия – 50 нМ, пунктирная линия – 25 нМ, штрих-пунктирная линия – 12.5 нМ, сплошная серая линия – контроль без белка. Для Lst-DspB сплошная черная линия – 500 нМ, пунктирная линия – 250 нМ, штрих-пунктирная линия – 125 нМ, сплошная серая линия – контроль без белка.

В качестве альтернативного способа сравнения антибактериальной активности были определены МИК лизоцифаина и Lst-DspB, то есть минимальные концентрации этих белков, подавляющие бактериальный рост. Для лизоцифаина МИК 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, несмотря на идентичную каталитическую активность, антибактериальная активность Lst-DspB оказалась существенно ниже активности

лизостафина. Вероятнее всего, это связано с увеличением молекулярной массы за счет слияния с дисперсином.

3.15 Действие лизостафина, дисперсина, их смеси и Lst-DspB на биоплёнки *S. aureus*

Далее было изучено действие исследуемых белков – лизостафина, дисперсина и Lst-DspB – в отношении биоплёнок *S. aureus*. Для культивации биоплёнок *S. aureus* было использовано два варианта питательной среды – с добавлением и без добавления плазмы крови крыс. *S. aureus* продуцирует коагулазу – белок, связывающийся с протромбином плазмы крови и активирующий его. Активированный таким образом протромбин гидролизует фибриноген, присутствующий в плазме крови, с образованием фибрина, который встраивается в матрикс биоплёнок *S. aureus*. Благодаря этому биоплёнки *S. aureus*, культивированные в присутствии плазмы крови и без неё, имеют различную морфологию и отличаются чувствительностью к действию антибактериальных агентов, в том числе лизостафина и дисперсина.

Лизостафин показал более высокую активность в отношении биоплёнок *S. aureus*, культивированных без плазмы крови. Так, при обработке биоплёнок, выращенных в течение 24-х часов на дне лунок 96-луночных планшетов, разными концентрациями лизостафина в течение 2-х часов, практически полная элиминация биоплёнки достигается уже при использовании 2.5 мкг/мл лизостафина (рис. 41). Напротив, при культивации биоплёнок в присутствии плазмы крови, даже 12.8 мкг/мл лизостафина не способны полностью элиминировать биоплёнку за 2 часа (рис. 42).

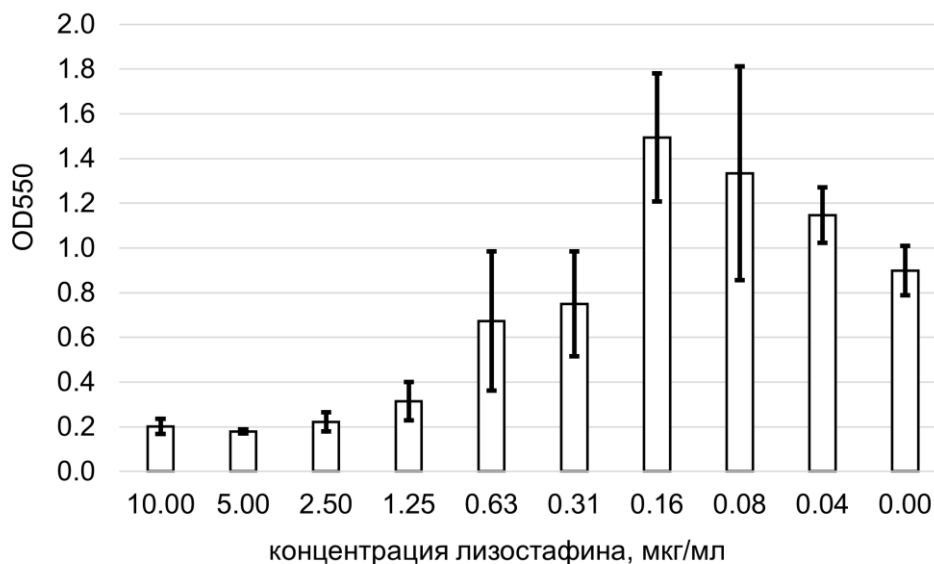


Рисунок 41. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивированных без крысиной плазмы крови, разными концентрациями лизостафина.

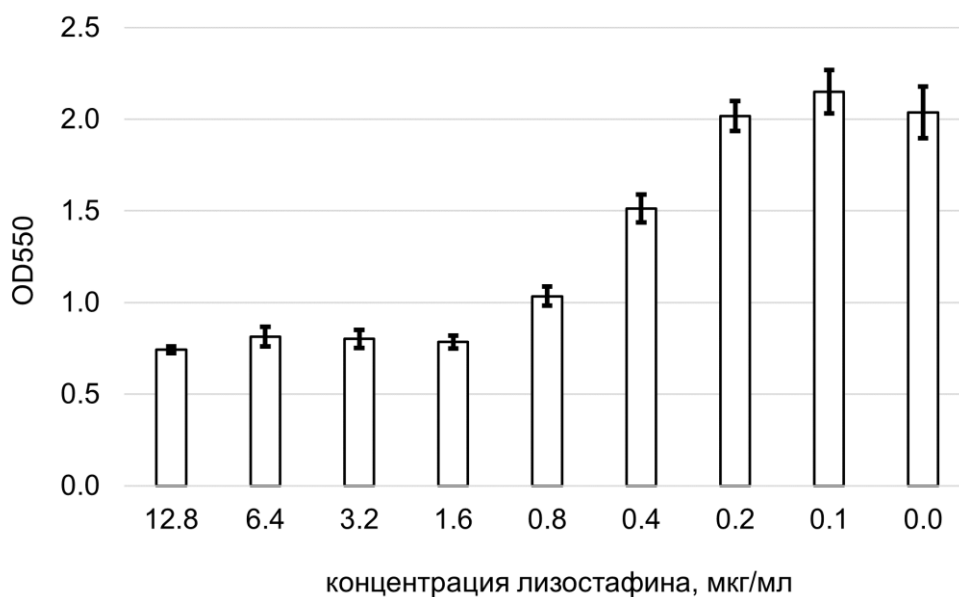


Рисунок 42. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивированных в присутствии крысиной плазмы крови, разными концентрациями лизостафина.

Биоплёнки *S. aureus*, культивированные без плазмы крови на дне лунок 96-луночных планшетов, достаточно непрочные и легко смываются, что может объяснять более высокую активность лизостафина в их отношении. Для того чтобы проверить это предположение, биоплёнки были также выращены на покровных

стеклах. Такие биоплёнки обладают большей прочностью. Тем не менее, после обработки 2 мкг/мл лизостафина, наблюдалась практически полная их элиминация, как и в случае с биоплёнками в 96-луночных планшетах (рис. 43).

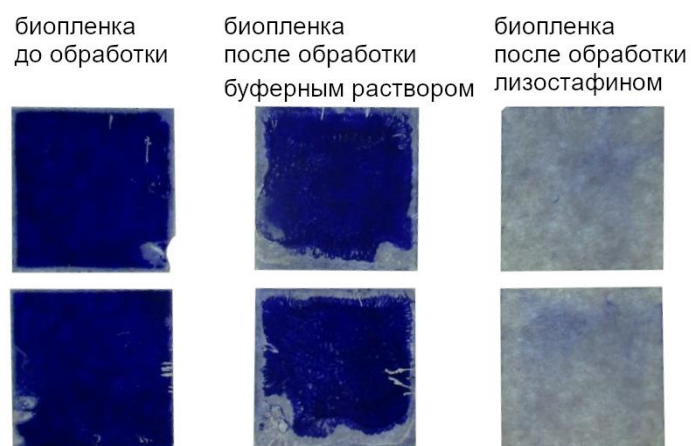


Рисунок 43. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивированных на покровных стеклах без крысиной плазмы крови, 2 мкг/мл лизостафина.

В отличие от лизостафина, дисперсин действовал только на биоплёнки, культивированные в присутствии плазмы крови, и не показывал никакой активности в отношении биоплёнок, выращенных без плазмы (рис. 44).

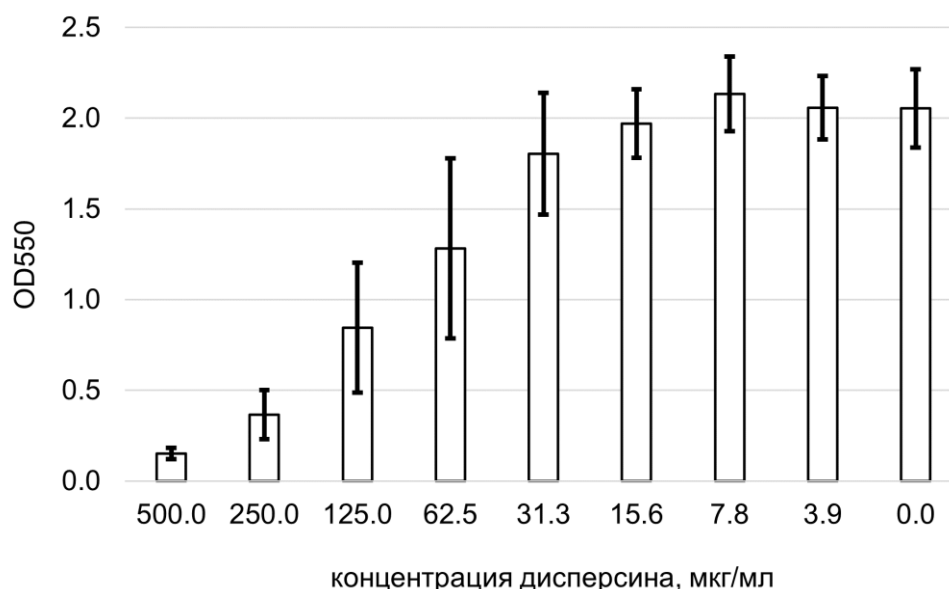


Рисунок 44. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивированных в присутствии крысиной плазмы крови, разными концентрациями дисперсина.

В связи с этим, дальнейшие эксперименты проводились только на биоплёнках, культивированных в присутствии плазмы крови.

Химерный белок Lst-DspB, в отличие от лизостафина, оказался способен практически полностью элиминировать биоплёнку *S. aureus* (рис. 45). При этом концентрации Lst-DspB, необходимые для элиминации биоплёнки, были на порядок меньше концентраций дисперсина, достигающих аналогичного эффекта (рис. 45). Таким образом, Lst-DspB превосходил по своим антибиоплёночным свойствам оба исходных белка.

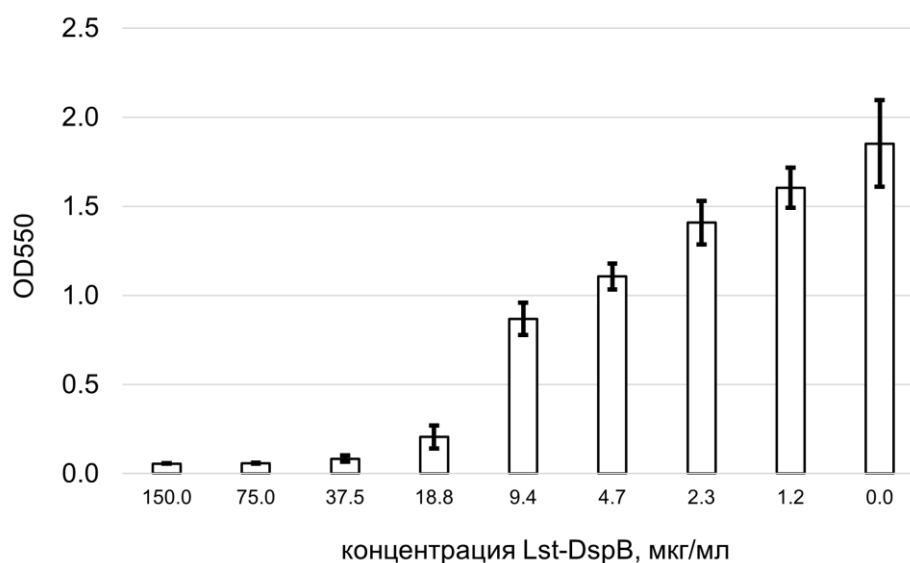


Рисунок 45. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивированных в присутствии крысиной плазмы крови, разными концентрациями Lst-DspB.

Поскольку Lst-DspB содержит в себе два активных компонента – лизостафин и дисперсин, необходимо было сравнить его эффективность с действием простой смеси лизостафина и дисперсина. Исследование совместного действия лизостафина и дисперсина показало, что при использовании 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. 46).

А

дисперсин, мкг/мл	лизостафин, мкг/мл							
	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0
250	3.2	3.1	3.3	6.2	11.6	52.6	16.7	11.3
125	3.5	4.2	5.3	10.9	22.0	59.7	66.2	94.8
62.5	8.4	10.4	12.1	22.3	48.7	75.1	106.5	74.0
31.3	15.9	25.0	29.5	47.8	54.7	87.1	111.6	75.4
15.6	36.8	40.1	44.7	45.4	57.5	81.7	112.6	114.0
0	37.6	42.7	51.1	49.3	73.2	85.9	123.4	100.0

Б

дисперсин, мкг/мл	лизостафин, мкг/мл							
	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0
250	4.3	4.8	5.8	5.6	8.3	9.7	14.0	11.3
125	35.7	40.5	48.4	46.8	69.4	81.5	117.0	94.8
62.5	27.8	31.6	37.8	36.5	54.1	63.6	91.3	74.0
31.3	28.4	32.2	38.5	37.2	55.1	64.8	93.0	75.4
15.6	42.9	48.7	58.2	56.2	83.4	97.9	140.6	114.0
0	37.6	42.7	51.1	49.3	73.2	85.9	123.4	100.0

Рисунок 46. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивированных в присутствии крысиной плазмы крови, комбинацией лизостафина и дисперсина в разных молярных соотношениях. А – биоплёнка после обработки лизостафином и дисперсином, процент от контроля; Б – ожидаемое количество биоплёнки после обработки лизостафином и дисперсином исходя из предположения об аддитивном действии, процент от контроля.

При сравнении активности Lst-DspB с простой смесью лизостафина и дисперсина, взятых в эквимольных концентрациях, оказалось, что Lst-DspB более эффективен в концентрациях 280 нМ и выше, в то время как при снижении концентрации простая смесь лизостафина и дисперсина показывает несколько большую активность (рис. 47).

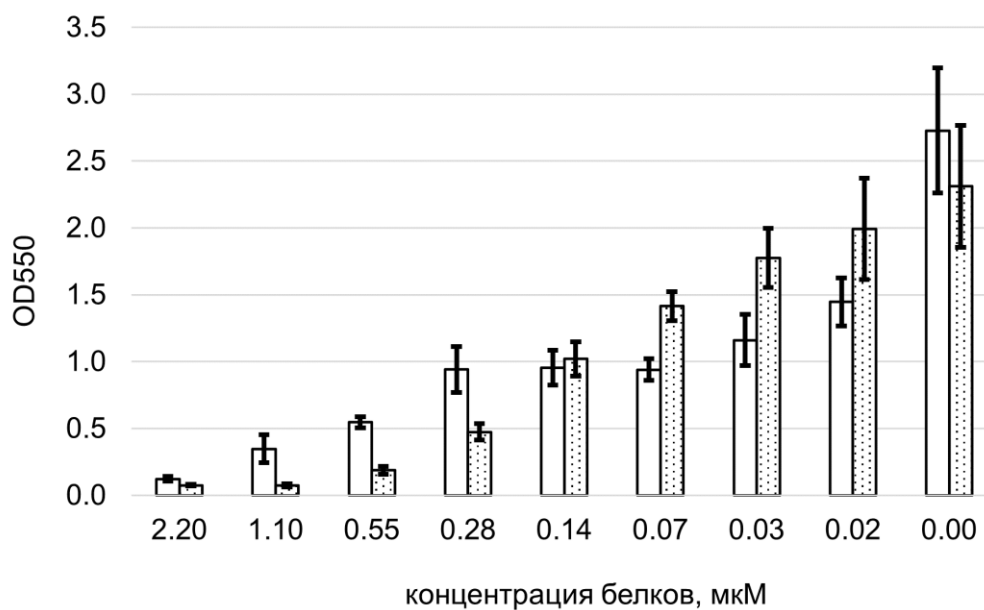


Рисунок 47. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивированных в присутствии крысиной плазмы крови, Lst-DspB (заштрихованные столбцы) в сравнении с простой смесью лизоцифа и дисперсина в эквимоллярных концентрациях (пустые столбцы).

Как было показано выше, бактериолитическая активность Lst-DspB более чем в 10 раз уступает бактериолитической активности исходного лизоцифа. Поэтому для того, чтобы корректно оценить эффект от слияния лизоцифа и дисперсина в один химерный белок, более правильным может быть использование не эквимоллярных концентраций лизоцифа и дисперсина, а концентраций, выравненных по уровню антибактериальной активности. Сравнение антибиоплёночной активности Lst-DspB со смесью лизоцифа и дисперсина, в которой концентрация лизоцифа нормирована на уровень бактериолитической активности Lst-DspB, показало, что химерный белок Lst-DspB превосходит по эффективности простую смесь лизоцифа и дисперсина на всем диапазоне концентраций (рис. 48).

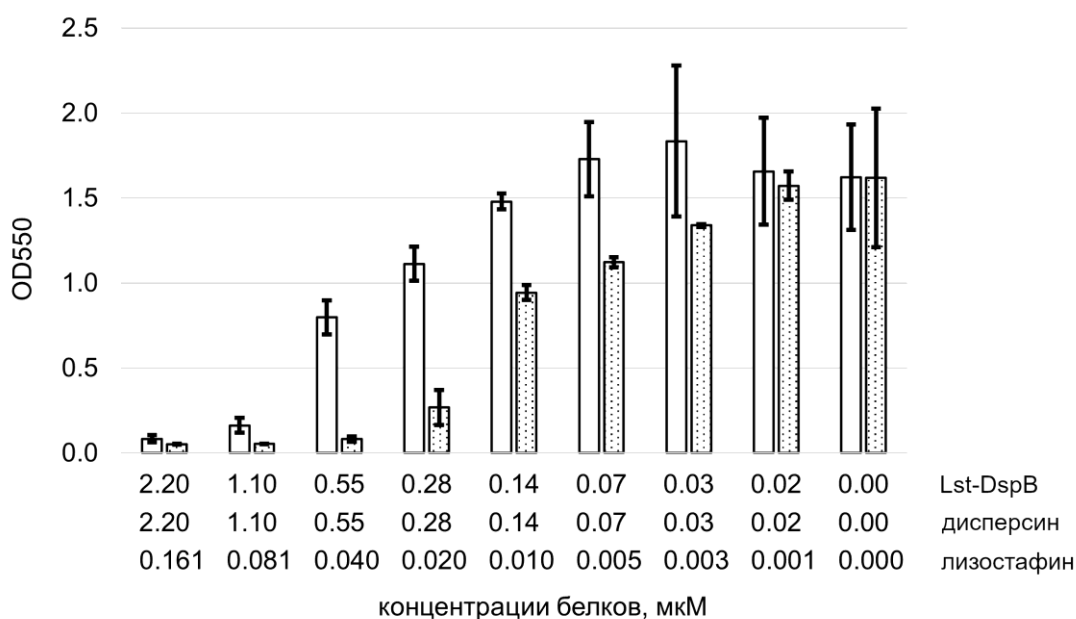


Рисунок 48. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивируемых в присутствии крысиной плазмы крови, Lst-DspB (заштрихованные столбцы) в сравнении с простой смесью лизостафина и дисперсина в концентрациях, нормированных по уровню активности (пустые столбцы).

Таким образом, слияние лизостафина и дисперсина в химерный белок Lst-DspB позволяет повысить антибиоплёночную активность как по сравнению с каждым из исходных белков по-отдельности, так и по сравнению с простой смесью этих белков. Такой химерный белок, однако, обладает сниженной бактериолитической активностью.

3.16 Адсорбция и высвобождение лизостафина и дисперсина из диоксида

Для того, чтобы исследовать возможность использования лизостафина и дисперсина для предотвращения развития послеоперационного остеомиелита, лизостафин и дисперсин были сорбированы на порошок диоксида — кальций-магниевого силикатной керамики ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), перспективной с точки зрения применения в составе материалов для костной пластики. Порошок диоксида адсорбировал из раствора как лизостафин (5.2 мкг лизостафина на 1 мг диоксида), так и дисперсин (5.9 мкг дисперсина на 1 мг диоксида) (рис. 49).

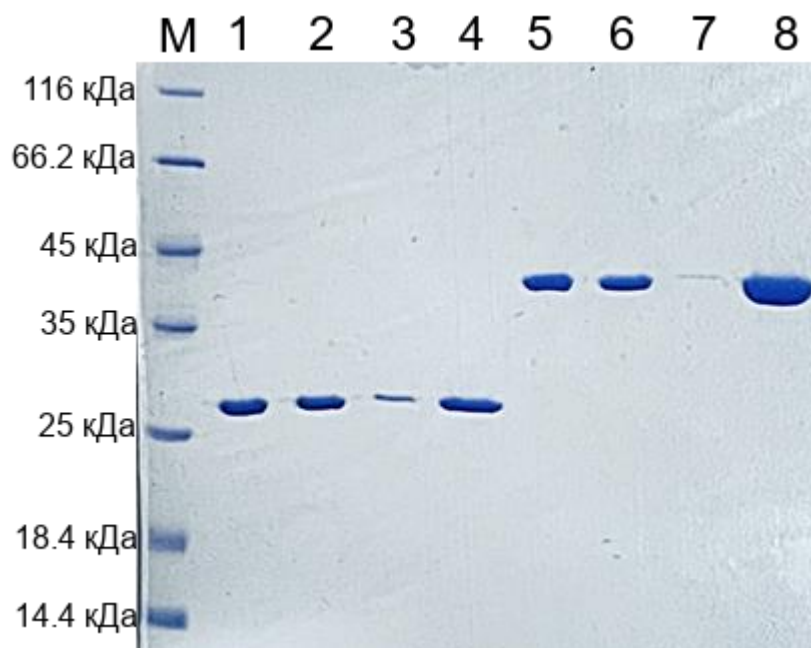


Рисунок 49. Адсорбция лизоцифина и дисперсина порошком диопсида. Полиакриламидный гель (12% акриламида), М – маркер молекулярного веса, 1 – лизоцифин до адсорбции на диопсид (5 мкл), 2 – не связавшийся лизоцифин (5 мкл), 3 – промывочный буфер после адсорбции лизоцифина (5 мкл), 4 – адсорбированный лизоцифин (5 мкл), 5 – дисперсин до адсорбции на диопсид (5 мкл), 6 – не связавшийся дисперсин (5 мкл), 7 – промывочный буфер после адсорбции дисперсина (5 мкл), 8 – адсорбированный дисперсин (10 мкл).

Для оценки динамики выхода адсорбированного на диопсиде лизоцифина и дисперсина, диопсид инкубировался в буферном растворе, и через определённые промежутки времени количество вышедшего белка оценивалось по уровню соответствующей активности, а в случае лизоцифина – также с помощью ИФА. На протяжении эксперимента выходило примерно 30% от всего адсорбированного лизоцифина. При этом две трети этого количества выходило в течение первых 5 часов, а после 24-х часов выход лизоцифина практически прекращался, что подтверждалось как данными по уровню антибактериальной активности, так и измерением количества вышедшего лизоцифина с помощью ИФА (рис. 50-51).

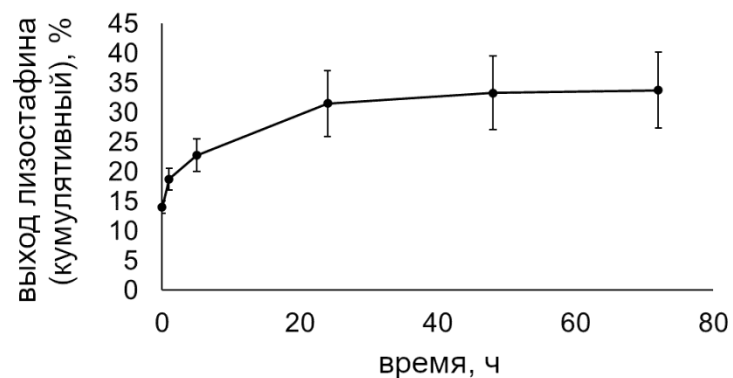


Рисунок 50. Выход лизостафина с диопсида. Количество вышедшего лизостафина определено с помощью ИФА и нормировано на количество адсорбированного на диопсиде лизостафина.

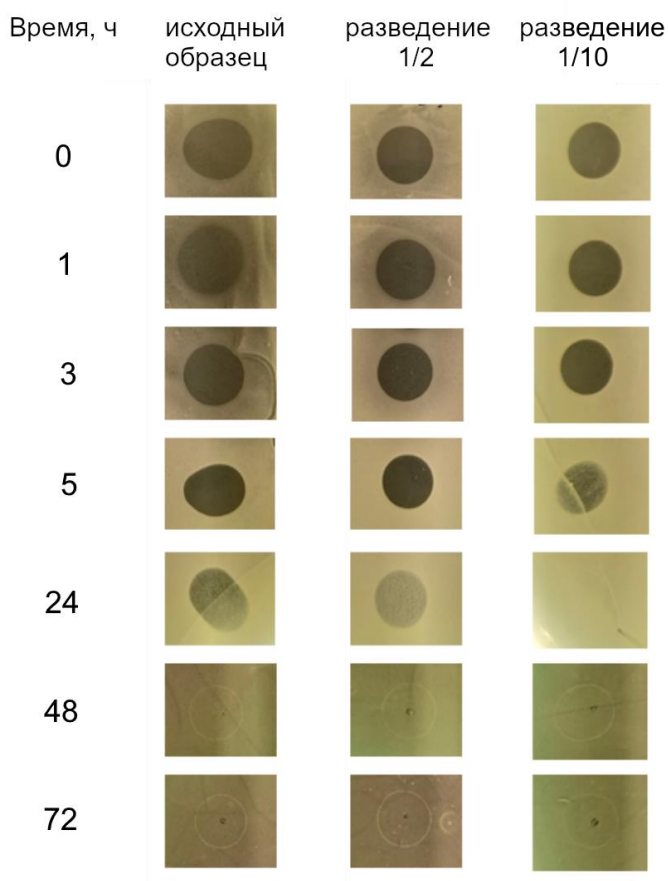


Рисунок 51. Антибактериальная активность лизостафина, вышедшего с диопсида через разные промежутки времени. Антибактериальное действие определялось по наличию зон лизиса при нанесении образцов, а также двукратных и десятикратных разведений образцов, на твердую питательную среду, засеянную *S. aureus*.

Дисперсин, по всей видимости, сорбировался на порошок диопсида необратимо, поскольку ни определение гликозид-гидролазной активности, ни детектирование дисперсина с помощью электрофореза в полиакриламидном геле не показало сколько-нибудь заметного выхода дисперсина с диопсида в течение 72-х часов. В связи с этим в дальнейших экспериментах исследовался только диопсид с адсорбированным на нем лизостафином.

3.17 Антибактериальная и антибиоплёночная активность диопсида с лизостафином

Для того, чтобы исследовать антибактериальную активность диопсида с адсорбированным на нем лизостафином, было определено значение МИК для такого диопсида. МИК диопсида оказалась равна 0.06 мг/мл, что соответствует примерно 0.31 мкг/мл адсорбированного лизостафина. При этом МИК свободного лизостафина была равна 0.1 мкг/мл. Контрольный порошок диопсида без лизостафина не обладал антибактериальной активностью. Таким образом, антибактериальная активность лизостафина, сорбированного на поверхности диопсида, оказалась примерно в 3 раза меньше по сравнению со свободным лизостафином. Эти данные хорошо согласуются с количеством лизостафина, выходящего с диопсида (выходит примерно 30% от количества адсорбированного белка).

Для того, чтобы исследовать антибиоплёночную активность диопсида с адсорбированным лизостафином, биоплёнки *S. aureus* культивировались на дне лунок 24-х луночных планшетов, после чего в лунки планшетов вставлялись специальные вкладыши, дно которых представляет собой мембрану. Внутри вкладышей помещался порошок диопсида, благодаря чему диопсид не касался биоплёнки на дне лунки, в то время как вышедший с диопсида лизостафин мог свободно диффундировать через мембрану вкладыша и воздействовать на биоплёнку. Через 24 часа инкубации диопсида с адсорбированным на нем лизостафином, взятый в концентрациях 0.1 мг/мл и выше (эквивалентно 0.52 мкг/мл лизостафина) практически полностью разрушал биоплёнку (рис. 52А). Свободный лизостафин оказывал аналогичный эффект в концентрациях 0.035-0.07 мкг/мл и выше (рис. 52Б), в то время как контрольный диопсид не оказывал никакого эффекта. Таким образом, как и в случае с

МИК и МБК, активность лизостафина, сорбированного на диопсиде, оказывается ниже эквивалентных концентраций свободного лизостафина. Тем не менее, диопсид с адсорбированным на нем лизостафином показывает выраженный антибиоплёночный эффект, что делает его перспективным материалом для дальнейшего изучения.

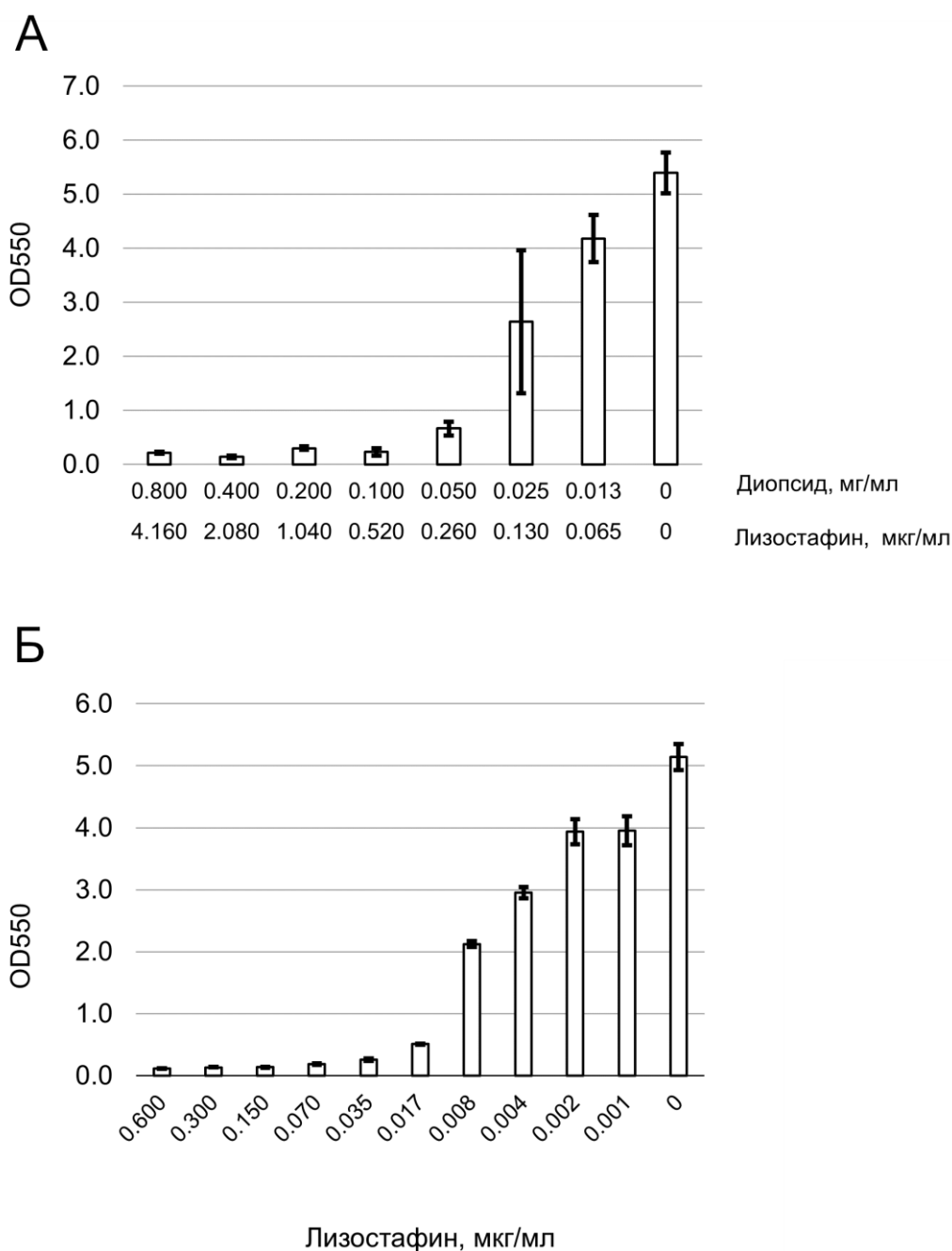


Рисунок 52. Разрушение биоплёнок *S. aureus* ATCC 29213, культивированных в присутствии крысиной плазмы крови, разными концентрациями диопсида с адсорбированным на нем лизостафином (А) или свободным лизостафином в качестве контроля (Б).

Глава 4. Обсуждение результатов

Целью данной работы являлось испытание природных олиго- и полисахаридов в качестве блокаторов функций лектина LecA *P. aeruginosa* и изучение их действия на бактериальные биоплёнки, а также исследование совместного действия ферментов лизоцина и дисперсина на биоплёнки *S. aureus*.

В качестве возможных блокаторов LecA был протестирован набор растительных олиго- и полисахаридов. Гемагглютинация, вызванная рекомбинантным LecA, ингибировалась олигосахаридами вербаскозой, галактозил-маннотриозой и дигалактозил-маннопентаозой, а также полисахаридами галактаном картофеля и галактоманнаном гуара. Все эти соединения содержат концевые остатки галактозы, с которыми, по всей видимости, и связывается LecA. Это связывание блокирует взаимодействие LecA с олигосахаридами на поверхности эритроцитов и, таким образом, предотвращает гемагглютинацию.

Взаимодействие LecA с олигосахаридами было исследовано более детально с помощью изотермальной калориметрии (ИТС). Все три олигосахарида показали способность связываться с лектином LecA. Константы диссоциации вербаскозы и галактозил-маннотриозы оказались сравнимы с константами диссоциации галактозы и ИПТГ и находились в диапазоне 40-60 мкМ. Константа диссоциации дигалактозил-маннопентаозы оказалась на порядок ниже и равнялась 4.1 мкМ. По всей видимости, такое различие связано с наличием в молекуле дигалактозил-маннопентаозы двух концевых остатков галактозы. Поскольку молекула дигалактозил-маннопентаозы слишком мала для того, чтобы одновременно связывать две молекулы LecA в составе одного тетрамера, увеличение аффинности, скорее всего, связано с эффектом “statistical rebinding” – локального увеличения концентрации остатков галактозы в окрестности сайта связывания лектина при его взаимодействии с дигалактозил-маннопентаозой (Wittmann, Pieters, 2013). Помимо этого, за счет наличия двух остатков галактозы одна молекула олигосахарида получает возможность одновременно связывать две молекулы лектина из разных тетрамеров. Это подтверждается значением стехиометрии связывания, значительно меньшим единицы (в данном случае 0.67). Кроме того, при инкубации раствора лектина LecA в

присутствии дигалактозил-маннопентаозы образуется видимый невооружённым глазом осадок, в то время как инкубация лектина с галактозил-маннотриозой не дает подобного эффекта. Вероятно, это объясняется нековалентной «перешивкой» тетрамеров LecA между собой за счет одновременного связывания одной молекулы дигалактозил-маннопентаозы двумя тетрамерами LecA. Благодаря таким свойствам, аффинность дигалактозил-маннопентаозы к LecA (K_D 4.1 мкМ) оказывается выше, чем аффинность остальных олигосахаридов: как исследованных в данной работе, так и описанных в литературе (Blanchard *et al.*, 2008; Nurisso *et al.*, 2010).

Поскольку только дигалактозил-маннопентаоза показала существенный прирост аффинности к LecA по сравнению с галактозой, только для неё была в дальнейшем исследована способность подавлять образование биоплёнок *P. aeruginosa*. Однако, несмотря на взаимодействие с LecA, дигалактозил-маннопентаоза не подавляла образование биоплёнок штамма *P. aeruginosa* PAO1 и клинического изолята 216. Напротив, в случае обоих штаммов наблюдался эффект стимулирования образования биоплёнок дигалактозил-маннопентаозой в максимальной использованной концентрации 2 мг/мл. На настоящий момент не ясно, с чем связан подобный эффект. Одна из предполагаемых функций лектина LecA – скрепление между собой молекул полисахарида матрикса и/или иммобилизация бактериальных клеток в матриксе биоплёнок. Поскольку дигалактозил-маннопентаоза, по всей видимости, способна «перешивать» молекулы лектина между собой, при недостаточной концентрации дигалактозил-маннопентаозы вместо полного блокирования функции LecA это может приводить к усилению агрегации бактерий и увеличению связности и прочности бактериальной биоплёнки. Схожий эффект наблюдался ранее в литературе для тетравалентных галактозилированных гликокластеров – блокаторов LecA (Boukerb *et al.*, 2014). Эти соединения эффективно агрегировали бактериальные клетки в диапазоне концентраций 100 мкМ – 1 мМ, но этот эффект исчезал при повышении концентрации до 5 мМ. При этом такие гликокластеры подавляли образование биоплёнок *P. aeruginosa* PAO1 только в концентрации 5 мМ и не оказывали никакого эффекта в концентрации 100 мкМ.

Теоретически, более выраженный эффект мультивалентного связывания по сравнению с олигосахаридами должны показывать полисахариды. В данной работе

ряд полисахаридов был протестирован на способность подавлять гемагглютинацию, вызванную лектином LecA. Интересно, что именно полисахариды галактан картофеля и галактоманнан гуара, содержащие множество остатков галактозы, оказались способны подавлять гемагглютинацию. Галактан картофеля представляет собой линейный полисахарид с небольшой степенью разветвления и преимущественно состоит из остатков галактозы. Галактоманнан гуара состоит из линейных цепочек остатков маннозы, к части из которых 1,6 гликозидными связями присоединены остатки галактозы. Оба галактозосодержащих полисахарида также ингибировали начальные стадии образования биоплёнок изолята *P. aeruginosa* 216 дозозависимым образом, причём наибольшую эффективность показал галактан картофеля. В связи с этим он был выбран для более детального изучения его активности в отношении биоплёнок.

Для этого помимо стандартных методов анализа биоплёнок была также использована разработанная в данной работе методика культивации биоплёнок *P. aeruginosa* на полипропиленовых купонах, вертикально вставлённых в лунки 96-луночных планшетов. Как правило, для оценки общей биомассы биоплёнки культивируются на стенках лунок 96-луночных планшетов или CBD. Такие биоплёнки, однако, невозможно изучать с помощью микроскопии (за исключением электронной микроскопии в случае CBD). Для этого обычно используют биоплёнки, выращенные на покровных стеклах, погружённых в питательную среду. Таким образом, очень часто оценка количества биомассы с одной стороны, и микроскопия с другой стороны проводятся для биоплёнок, сформировавшихся в разных условиях. Биоплёнки, культивированные на купонах, вставлённых вертикально в лунки планшета, подходят как для исследования с помощью стандартной светлопольной и флуоресцентной микроскопии, так и для оценки количества биомассы, а также подсчета жизнеспособных клеток. При этом, в отличие от методики с покровными стеклами, в этой методике биоплёнка образуется на границе между питательной средой и воздухом. Это важно, поскольку *P. aeruginosa* предпочтительно формирует биоплёнки именно на границе раздела фаз воздух-вода.

Галактан картофеля препятствовал образованию биоплёнок двух разных штаммов *P. aeruginosa* (коллекционного и клинического). Точный механизм

ингибирования образования биоплёнок галактаном не известен. Он не связан с подавлением жизнеспособности бактерий, поскольку галактан не обладает прямым бактерицидным или бактериостатическим действием. Имеющиеся данные позволяют выдвинуть предположение о том, что галактан вызывает чрезмерную или в каком-то другом отношении неоптимальную, «неправильную» агрегацию бактериальных клеток, препятствуя формированию нормальной структуры биоплёнки и подавляя её развитие. Исследование биоплёнок *P. aeruginosa* с помощью микроскопии показало, что в присутствии галактана бактерии способны прикрепляться к поверхности полипропилена, но практически не формируют микроколоний и полностью не способны формировать крупные прикреплённые агрегаты. По-видимому, галактан, в отличие от некоторых других полисахаридов, подавляющих образование биоплёнок, не изменяет гидрофобные свойства поверхности субстрата или бактериальных клеток и не препятствует первоначальной адгезии бактерий. Также галактан, вероятнее всего, не блокирует взаимодействие бактериальных клеток друг с другом. Культивация бактерий в присутствии галактана вызывает увеличение мутности бактериальной суспензии, но не количества КОЕ в суспензии по сравнению с контролем, что указывает на стимулирование агрегации бактерий под действием галактана. Кроме того, при культивации *P. aeruginosa* в присутствии галактана, но не в контрольных образцах, наблюдались видимые невооружённым глазом бактериальные агрегаты. По всей видимости, агрегаты, сформированные под действием галактана, благодаря своему размеру и/или неправильной архитектуре не способны удерживаться на поверхности субстрата и оказываются суспендированы в среде. Такой механизм действия мог бы быть обусловлен взаимодействием галактана с лектином LecA и/или сходством его химической структуры с полисахаридом матрикса биоплёнок Pel (состоит из галактозамина и N-ацетилгалактозамина (Mauff Le *et al.*, 2022)).

Галактан не только подавляет образование биоплёнок, но и оказывает заметный эффект на сформированные биоплёнки, причём этот эффект зависит от штамма. Биоплёнки PAO1 под действием галактана частично разрушаются, но сохраняют основные черты морфологии контрольных биоплёнок. Напротив, в биоплёнках изолята 216 при обработке галактаном не меняется количество биомассы, но

полностью теряется выраженная морфология, присущая контрольным биоплёнкам. С одной стороны, это говорит о том, что для двух использованных в данной работе штаммов – PAO1 и 216 – разные компоненты матрикса, по-видимому, вносят разный вклад в организацию и поддержание структуры биоплёнок. Такая вариабельность была показана для разных штаммов *P. aeruginosa* и может развиваться, в частности, в процессе адаптации к условиям существования в легких больных муковисцидозом (Colvin *et al.*, 2011; Mann, Wozniak, 2012; Sousa, Pereira, 2014). С другой стороны, это подтверждает предположение о том, что галактан вызывает «неправильную» агрегацию клеток *P. aeruginosa*, что можно напрямую наблюдать в случае биоплёнок изолята 216.

Другим интересным моментом является зависимость влияния галактана на биоплёнку *P. aeruginosa* от его концентрации. При достаточно высоких концентрациях (1 мг/мл и выше) образование биоплёнок подавлено. Однако при концентрациях галактана порядка 100 мкг/мл наблюдается увеличение количества биомассы в биоплёнках обоих исследованных штаммов. Таким образом, галактан в достаточно низкой концентрации либо стимулирует образование биоплёнок, либо увеличивает их прочность, благодаря чему большее количество биомассы остается после отмывки биоплёнок от планктонных клеток. В любом случае, этот эффект аналогичен эффекту, наблюдаемому в случае культивирования биоплёнок в присутствии дигалактозил-маннопентаозы. С одной стороны, это говорит о вероятной схожести механизмов действия дигалактозил-маннопентаозы и галактана на биоплёнку *P. aeruginosa*. С другой стороны, это свидетельствует в пользу гипотезы об избыточной агрегации бактерий как механизме действия галактана: при низких концентрациях галактан ещё не мешает «правильным» взаимодействиям между компонентами матрикса и бактериальными клетками, но уже делает структуру биоплёнки прочнее за счет дополнительного скрепления бактериальных клеток между собой.

Наконец, необходимо заметить, что подавление образования биоплёнок за счет избыточной агрегации бактериальных клеток уже было описано в литературе. Было показано, что штаммы *Bordetella holmesii*, не способные синтезировать белок внешней мембраны VirA, формируют крупные агрегаты в суспензии, но не образуют

биоплёнок (Hiramatsu *et al.*, 2016). Хотя в этом случае не наличие дополнительного агрегирующего агента, а наоборот, отсутствие белка, препятствующего агрегации, нарушает процесс формирования биоплёнок, связь «неправильной» агрегации и неспособности бактерий образовывать биоплёнки прослеживается как в случае *P. aeruginosa*, так и *B. holmesii*.

Интересно, что галактан влиял на формирование биоплёнок не только *P. aeruginosa*, но и *S. maltophilia*. Морфология биоплёнок *S. maltophilia*, культивированных в присутствии галактана, существенно отличалась от контрольных. *S. maltophilia*, как и *P. aeruginosa*, образует биоплёнки на стенках лунок 96-луночных планшетов в виде полосы на границе раздела фаз среда/воздух. Под воздействием галактана ширина «полосы» биоплёнки *S. maltophilia* уменьшалась, также она становилась менее однородной. При этом количество биомассы в таких биоплёнках хотя и снижалось, но незначительно. Кроме того, как и в случае *P. aeruginosa*, суспензия бактерий *S. maltophilia*, культивированных в присутствии галактана, показывала существенно большую мутность по сравнению с контрольной культурой. В то же время на биоплёнки *B. cenocepacia* галактан не оказывал практически никакого влияния. На настоящий момент генов, гомологичных *lecA*, не было обнаружено ни в геномах *S. maltophilia*, ни в геномах *B. cenocepacia*. При этом в составе полисахаридов матрикса биоплёнок *S. maltophilia* присутствует галактозамин и небольшое количество галактозы (Akbar, 2016). Возможно, геном *S. maltophilia* кодирует какой-то другой лектин, способный связывать галактозу, что позволяет клеткам *S. maltophilia* взаимодействовать с галактаном аналогично клеткам *P. aeruginosa*. С другой стороны, нельзя исключить, что действие галактана не связано с какими-либо специфическими взаимодействиями и обусловлено другим механизмом.

Основная проблема, связанная с образованием бактериальных биоплёнок, заключается в их повышенной устойчивости к используемым в клинической практике антибиотикам, а главной задачей соединений, разрушающих бактериальные биоплёнки, является увеличение чувствительности бактерий, находящихся внутри биоплёнки, к антибиотикам. Один из наиболее прямых и легко измеряемых показателей, характеризующих устойчивость биоплёнки к какому-либо антибиотику – минимальная концентрация эрадикации биоплёнки (МКЭБ). Под МКЭБ понимается

такая концентрация антибиотика, после обработки которой в биоплёнке не остается жизнеспособных бактерий. Теоретически, соединение, способное разрушать бактериальные биоплёнки, должно снижать МКЭБ антибиотиков. Для многих веществ подобный эффект действительно был продемонстрирован (см., например, (Alkawash *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2011; Nair *et al.*, 2016; Pestrak *et al.*, 2019; Reffuveille *et al.*, 2014)). Галактан, однако, оказался не способен снизить МКЭБ ни одного из трёх протестированных антибиотиков ни на одном из исследованных штаммов. При этом интересно, что даже биоплёнки, культивированные в присутствии галактана и представленные главным образом отдельными прикрепленными к поверхности клетками, характеризовались такими же значениями МКЭБ для всех исследованных антибиотиков, что и контрольная биоплёнка. По всей видимости, для использованных в данной работе сочетаний штаммов, антибиотиков и условий культивирования ключевым вкладом в устойчивость к антибиотикам является не нахождение бактерий внутри матрикса биоплёнки, а их физиологическое состояние и иммобилизация на поверхности. Подобный эффект был показан ранее, например, для *S. epidermidis* (Qu *et al.*, 2010).

Другим интересным наблюдением, связанным с определением МКЭБ, оказалось то, что хотя после обработки амикацином в концентрации 256 мкг/мл биоплёнки *P. aeruginosa* не могли возобновить рост в питательной среде без антибиотика, жизнеспособные клетки в таких биоплёнках сохранялись. При физическом разрушении биоплёнки или помещении её в среду, содержащую достаточное количество фосфатов, эти сохранившие жизнеспособность клетки переходили к активному размножению. Более того, галактан оказывал на такие предварительно обработанные амикацином биоплёнки эффект, аналогичный их физическому разрушению – под действием галактана оставшиеся жизнеспособными клетки возобновляли рост. Это лишний раз подтверждает предположение о том, что галактан нарушает нативную структуру биоплёнки и «правильную» агрегацию бактерий.

Анализ количества жизнеспособных бактерий, оставшихся в обработанных антибиотиками биоплёнках, показал, что при одновременном применении антибиотиков и галактана не только не наблюдается повышение чувствительности

биоплёнок *P. aeruginosa* к антибиотикам, но, напротив, в некоторых случаях добавление галактана приводит к увеличению количества жизнеспособных клеток в биоплёнке. В случае амикацина, для которого этот эффект оказался наиболее выраженным, галактан повышал количество жизнеспособных клеток на несколько порядков. Теоретически, это могло бы объясняться способностью галактана стимулировать переход бактериальных клеток в обработанной антибиотиками биоплёнке к активному размножению. Однако результаты флуоресцентной микроскопии показали, что в биоплёнках, обработанных амикацином в сочетании с галактаном, действительно сохраняется существенно больше клеток с интактной мембраной (и, следовательно, с большой вероятностью сохраняющих жизнеспособность) по сравнению с биоплёнками, обработанными только амикацином. Таким образом, при совместном применении галактан защищает бактерии внутри биоплёнки от действия антибиотика. Галактан является первым полисахаридом, который демонстрирует подобные свойства и при этом не является естественным компонентом матрикса биоплёнок.

При этом схожий эффект в отношении биоплёнок *P. aeruginosa* наблюдался при их обработке белком *A. S. aureus* (SpA) (Beaudoin *et al.*, 2017). Было показано, что SpA взаимодействует с полисахаридом матрикса биоплёнок *P. aeruginosa* Psl, и это взаимодействие приводит к формированию агрегатов, более плотных по сравнению с нормальной структурой биоплёнки *P. aeruginosa*. Такие биоплёнки с изменённой структурой были более устойчивы к действию тобрамицина – антибиотика из класса аминогликозидов, схожего по структуре с амикацином. Как и SpA, галактан вызывает «излишнюю» агрегацию бактериальных клеток. Вероятно, это приводит либо к затруднению доступа к ним антибиотиков, либо к изменению их физиологического состояния и снижению чувствительности. В результате, хотя молекулярные механизмы, стоящие за избыточной агрегацией клеток *P. aeruginosa* в случае галактана и SpA, очевидно, различны, в обоих случаях они защищают бактерии внутри биоплёнок от действия антибиотиков, в первую очередь аминогликозидов.

Таким образом, хотя галактан и препятствовал образованию биоплёнок, а также частично разрушал уже сформированные биоплёнки, его совместное применение с антибиотиками приводило к снижению их эффективности. По всей видимости, оба

этих эффекта связаны с тем, что под воздействием галактана меняется характер и плотность агрегации бактериальных клеток. Кроме того, при снижении концентрации галактана ниже определенного значения наблюдалась стимуляция образования биоплёнки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение полисахаридов для подавления роста бактериальных биоплёнок хотя и представляется привлекательным с технологической точки зрения, может приводить к неблагоприятным результатам. Известно, что в организме человека бактерии часто существуют не в виде прикрепленных к субстрату бактериальных сообществ, а в форме агрегатов диаметром порядка 4-100 мкм (Alhede *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2015). При этом галактан подавляет формирование именно биоплёнок, связанных с поверхностью пластика, увеличивая количество агрегатов в среде. Подобный эффект может привести к усилению инфекции.

Второй частью данной работы было исследование подходов к борьбе с биоплёнками *S. aureus*, основанных на одновременном ферментативном разрушении клеточных стенок и полисахаридов матрикса биоплёнок золотистого стафилококка. Для этой цели был использован лизостафин в качестве компонента, обладающего литическим действием в отношении клеток *S. aureus*, и дисперсин в качестве компонента, гидролизующего полисахарид поли-N-ацетилглюкозамин.

По-отдельности эффективность в отношении биоплёнок *S. aureus* была ранее показана как для лизостафина, так и для дисперсина. Так, в работе Wu и соавт. (Wu *et al.*, 2003) лизостафин способствовал полной эрадикации биоплёнок в 96-луночных планшетах в течение 3-х часов в концентрации 0.8 мкг/мл (при инкубации в PBS) или 12.5 мкг/мл (при инкубации в питательной среде). В работах других исследователей концентрации лизостафина, необходимые для эрадикации биоплёнок *S. aureus*, варьировали в диапазоне 2-64 мкг/мл в зависимости от штамма, причём лизостафин одинаково эффективно действовал на биоплёнки, культивированные в планшетах и на полиэтиленовых катетерах (Hogan *et al.*, 2017; Walencka *et al.*, 2005). Действие дисперсина в отношении биоплёнок *S. aureus* показывает несколько большую вариабельность и, по всей видимости, в значительной степени определяется исследуемыми штаммами. Например, в работе Hogan и соавт. (Hogan *et al.*, 2017) дисперсин полностью разрушал биоплёнки одного из штаммов *S. aureus* за 6 часов в

концентрации 4 мкг/мл, но практически не оказывал влияния на биоплёнки другого штамма. Аналогичные результаты были продемонстрированы на большей выборке штаммов *S. aureus*, причём было показано, что действие дисперсина также зависит от состава питательной среды, использованной при культивации биоплёнок (Sugimoto *et al.*, 2018). Совместное действие лизостафина и дисперсина, однако, до сих пор не исследовалось. В данной работе была подтверждена эффективность лизостафина в отношении биоплёнок *S. aureus* в концентрациях, сравнимых с литературными данными. Эффективность дисперсина в отношении биоплёнок использованного штамма была относительно невысока, в связи с чем для эрадикации биоплёнок требовались достаточно большие концентрации белка. При этом применение дисперсина позволяло полностью удалить биоплёнки стафилококка, культивированные в присутствии плазмы, в то время как эффективность лизостафина была выше в отношении биоплёнок, культивированных в стандартной питательной среде. Комбинация двух ферментов показала наличие синергического эффекта и элиминации биоплёнок удалось достичь, используя существенно меньшие концентрации каждого из ферментов. Схожие данные были получены для комбинации других антибактериальных лизинов и ферментов, разрушающих матрикс биоплёнок (Olsen *et al.*, 2018; Simmons *et al.*, 2012; Sumrall *et al.*, 2021). Таким образом, комбинация двух ферментов разнонаправленного действия позволяет существенно увеличить их эффективность в отношении биоплёнок *S. aureus*.

В данной работе также была изучена возможность получения слитного белка, состоящего из лизостафина и дисперсина (Lst-DspB), и его относительная эффективность по сравнению с простой смесью двух ферментов. Такой слитный белок имел активность, присущую обоим исходным белкам, хотя бактериолитическая активность Lst-DspB была несколько снижена по сравнению с активностью нативного лизостафина. По всей видимости, это связано с увеличением размера белка, поскольку аналогичный эффект мы наблюдали ранее для лизостафина, слитого с альбумин-связывающим доменом (Grishin *et al.*, 2019). Несмотря на это, в диапазоне концентраций 0.3-2.2 мкМ Lst-DspB демонстрировал более высокую активность в отношении биоплёнок по сравнению с эквимольной смесью лизостафина и дисперсина. Этот эффект был ещё более выражен, когда в качестве сравнения

использовалась смесь лизостафина и дисперсина в концентрациях, эквивалентных концентрациям Lst-DspB по уровню бактериолитической и гликозидгидролазной активностей. Таким образом, комбинация двух ферментов, один из которых разрушает бактериальные клетки, а другой – полисахариды матрикса биоплёнки, в одном слитном белке позволяет повысить антибиоплёночную активность обоих исходных белков. Для дальнейшего повышения эффективности, однако, необходимо найти способ нивелировать негативное влияние увеличенной молекулярной массы на бактериолитическую активность слитного белка.

Остеомиелит – одна из основных инфекций, в которых *S. aureus* доминирует в качестве этиологического агента, более 50% всех случаев остеомиелита связаны с золотистым стафилококком (Masters *et al.*, 2019). До 5% всех операций по фиксации костей после перелома и до 2% операций по протезированию суставов сопровождаются развитием остеомиелита (Darouiche, 2004), а его лечение требует длительных курсов антибиотиков (4-6 недель), вводимых внутривенно, повторного хирургического вмешательства и замены протеза (Lew, Waldvogel, 2004). При этом формирование биоплёнок на поверхности имплантов, материалов для протезирования и костной пластики является ключевым фактором при развитии имплантат-ассоциированного остеомиелита (Masters *et al.*, 2019). Помимо формирования биоплёнок, терапию традиционными антибиотиками затрудняет также невысокая эффективность проникновения антибиотиков из кровотока внутрь кости, в связи с чем местное применение антибактериальных препаратов может быть предпочтительным при терапии остеомиелита. В связи с этим в данной работе была исследована возможность адсорбирования лизостафина и дисперсина на материалы для костной пластики для придания им антибактериальных и антибиоплёночных свойств. В качестве костно-пластического материала был использован диопсид – биосовместимая кальций-магниевая силикатная керамика с формулой $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$.

Лизостафин сорбировался на порошок диопсида в соотношении 5.2 мкг/мг, дисперсин – 5.9 мкг/мг. Эти данные показывают относительно невысокую сорбционную ёмкость диопсида в отношении обоих антибактериальных белков. Так, например, костный морфогенетический белок BMP-2 способен сорбироваться на порошок диопсида в количестве более 150 мкг/мг (Карягина и др. 2022). Хотя этого

количества оказывается достаточно для придания диопсиду антибактериальных свойств, для увеличения количества сорбируемого белка может потребоваться оптимизация условий адсорбции или модификация последовательности белка. Ранее было описано получение силиконовых катетеров, функционализированных лизостафином, в том числе за счет адсорбции на поверхность катетера (Jayakumar *et al.*, 2023). Сорбционная ёмкость силиконовых катетеров в отношении лизостафина оказалась равна 1.93 мг/см². К сожалению, эти цифры нельзя напрямую сравнить с результатами, полученными в данной работе, из-за разного формата материалов и неизвестной площади поверхности частиц диопсида (частицы неправильной формы и содержат поры различного размера).

Лизостафин характеризовался быстрой кинетикой выхода из порошка диопсида: большая его часть выходила в первые 5 часов. При этом суммарное количество вышедшего лизостафина составляло около 30% от всего сорбированного лизостафина, в то время как остальной белок связывался необратимо. Такой быстрый выход антибактериального агента с поверхности костно-пластического материала может быть предпочтителен, поскольку позволит быстро элиминировать бактерии, попавшие в область операции, и предотвратить развитие инфекции. Дисперсин связывался с поверхностью диопсида необратимо и не выходил даже при длительной инкубации.

Антибактериальное действие диопсида с сорбированным на нем лизостафином определялось количеством и динамикой выхода лизостафина в раствор. Так, МИК диопсида в пересчете на сорбированный лизостафин была примерно в 3 раза ниже, чем МИК свободного лизостафина, что объясняется ограниченным (30%) выходом лизостафина. Аналогичным образом, антибиоплёночная активность диопсида с сорбированным лизостафином была ниже таковой для свободного лизостафина примерно на порядок. В данном случае, по-видимому, роль играет не только количество, но и скорость выхода (и, следовательно, продолжительность действия) лизостафина. Поскольку лизостафин выходит из диопсида не одномоментно, суммарное время воздействия лизостафина на биоплёнку оказывается ниже, чем в случае свободного лизостафина. Это предположение подтверждается сравнением эффективности лизостафина в отношении биоплёнок *S. aureus* при 2-х часах

обработки (рис. 43) и 24-х часах обработки (рис. 53Б). В последнем случае оказывается возможным полное удаление биоплёнки при использовании более низких концентраций лизостафина. Таким образом, с учетом результатов, полученных в данной работе, а также литературных данных, лизостафин представляется перспективным ферментом для придания антибактериальных свойств костно-пластическим материалами и имплантатам.

Полученные результаты позволяют уточнить представления о перспективности изученных в данной работе подходов к созданию средств для борьбы с биоплёнками возбудителей оппортунистических инфекций. Несмотря на привлекательность использования природных олиго- и полисахаридов, связанную с их низкой стоимостью, понимание механизмов их действия недостаточно, что влечет за собой слабую предсказуемость поведения в разных условиях и в комбинации с другими веществами. Как уже отмечалось ранее, полисахариды, активные в отношении биоплёнок, имеют мало общего и могут отличаться как по химической структуре, так и по источнику их получения. Также не обнаруживается корреляции между структурой полисахарида и спектром бактерий, в отношении которых проявляется его антибиоплёночная активность. Результаты же данной работы показывают, что даже если какой-либо полисахарид демонстрирует способность ингибировать образование биоплёнок, его использование в другой концентрации может приводить к стимулированию образования биоплёнок, а эффект от его совместного применения с традиционными антибиотиками может быть противоположным ожидаемому. Таким образом, очевидно, что разработка антибиоплёночных средств на основе полисахаридов затруднена сложностью и недостаточной исследованностью этой области и подобные соединения вряд ли достигнут практического применения в ближайшее время.

Напротив, белки, обладающие ферментативной активностью, такие как антибактериальные лизины и ферменты, расщепляющие полисахариды матрикса биоплёнок, имеют понятный механизм действия и предсказуемую связь между концентрацией и эффективностью, а также имеют ряд других преимуществ. В частности, антибактериальные лизины обладают модульной архитектурой и состоят из доменов, что позволяет изучать биохимические и антимикробные свойства таких

доменов по-отдельности (Konstantinova *et al.*, 2022), что значительно упрощает понимание зависимости активности лизинов от их химической структуры и отличает их от олиго- и полисахаридов. Во-вторых, белковая природа лизинов и других ферментов позволяет управлять их фармакокинетическими свойствами за счет добавления дополнительных доменов (Grishin *et al.*, 2019), а также комбинировать разные типы активности в одном белке, что было показано в данной работе. Модификация же олиго- и полисахаридов с целью оптимизации их свойств, в том числе фармакокинетических, является более трудоемким и менее предсказуемым процессом. Также антимикробные лизины могут быть иммобилизованы на поверхности инертного носителя с целью адресной доставки и обеспечения контролируемого выхода (Kudinova *et al.*, 2023). Наконец, было показано, что развитие устойчивости к антибактериальным лизинам затруднено (Grishin *et al.*, 2020), что выгодно отличает их не только от полисахаридов (возможность развития устойчивости к антибиоплёночному полисахариду была продемонстрирована в одной из работ (Travier *et al.*, 2013)), но и от традиционных антибиотиков. Таким образом, в ближайшей временной перспективе такие соединения, как антимикробные лизины и ферменты, расщепляющие полисахариды матрикса биоплёнок, имеют большой шанс достичь широкого практического применения в качестве средств для борьбы с биоплёнками по сравнению с олиго- и полисахаридами.

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 (галактозил-маннотриоза 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 больший практический интерес по сравнению с олиго- и полисахаридами.

Выводы

1) Продemonстрирована 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) Продemonстрирована 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 продemonстрирована 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) Продemonстрирована возможность адсорбции лизостафина на кальций-магниевою 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 сокращений и условных обозначений

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

КОЕ – колониобразующие единицы

ЛПС – липополисахарид

МБК – минимальная бактерицидная концентрация

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МКЭБ – минимальная концентрация эрадикации биоплёнок

ВНИ – brain heart infusion

C4-HSL – N-butyryl-L-homoserine lactone

C12-HSL – N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone

CBD – Calgary biofilm device

DMSO – dimethyl sulfoxide

IQS – integrated quorum sensing signal

ITC – isothermal titration calorimetry

МБЕС – minimal biofilm eradication concentration

PBS – phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буферный раствор

TBS – tris buffered saline, буферно-солевой раствор на основе Трис

PQS – Pseudomonas quinolone signal

Список литературы

- 1) Беседнова Н.Н., Макаренкова И.Д., Звягинцева Т.Н., Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С. Ингибирующее действие полисахаридов морских гидробионтов на формирование биоплёнок // Антибиотики и Химиотерапия. 2016. Т. 61. № 9-10. С. 64-73.
- 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) Карягина А.С., Орлова П. ., Попонова М.С., Булыгина И.Н., Чоудхари Р., Жулина А.В., Грунина Т.М., Никитин К.Е., Струкова Н.В., Генералова М.С., Рязанова А.В., Ковалёва П.А., Зимина А.И., Лукинова Е.М., Плахотнюк Е.Д., Кирсанова М.А., Колесников Е.А., Захарова Е.В., Манских В.Н., Сенатов Ф.С., Громов А.В. Гибридные имплантаты на основе кальций-магниевой силикатной керамики диопсида в качестве носителя рекомбинантного BMP-2 и деминерализованного костного матрикса в качестве каркаса: динамика репаративного остеогенеза на модели краниотомии у мышей // Биохимия. 2022. Т. 87. № 11. С. 1683–1699.
- 4) Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биоплёнок: анти- и пробиоплёночные агенты // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 402–420.
- 5) Aaron S.D., Ferris W., Ramotar K., Vandemheen K., Chan F., Saginur R. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40. № 11. P. 4172–4179.
- 6) Abdelkader K., Gerstmans H., Saafan A., Dishisha T., Briers Y. The preclinical and clinical progress of bacteriophages and their lytic enzymes: The parts are easier than the whole // Viruses. 2019. V. 11(2). Article 96. Doi: 10.3390/v11020096
- 7) Abid Y., Casillo A., Gharsallah H., Joulak I., Lanzetta R., Corsaro M.M., Attia

- H., Azabou S. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 108. P. 719–728.
- 8) Akbar S. Gram negative bacterial biofilm formation and characterisation of extracellular polymeric substances // Doctoral thesis. University of Huddersfield. 2016.
 - 9) Alcorlo M., Martínez-Caballero S., Molina R., Hermoso J.A. Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017. V. 44. P. 87–100.
 - 10) Alhede M., Kragh K.N., Qvortrup K., Allesen-Holm M., Gennip M. van, Christensen L.D. Jensen P.Ø., Nielsen A.K., Parsek M., Wozniak D., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 11. Article e27943. Doi: 10.1371/journal.pone.0027943.
 - 11) Alkawash M.A, Soothill J.S., Schiller N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms // *APMIS.* 2006. V. 114. № 2. P. 131–138.
 - 12) Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59. № 4. P. 1114–1128.
 - 13) Alverdy J., Holbrook C., Rocha F., Seiden L., Licheng R., Wu R.L.; Musch M., Chang E., Ohman D., Suh S. Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host // *Ann. Surg.* 2000. V. 232. № 4. P. 480–489.
 - 14) Angeli A., Dupin L., Madaoui M., Li M., Vergoten G., Wang S., Meyer A., Géhin T., Vidal S., Vasseur J.-J., Chevlot Y., Morvan F. Glycoclusters with additional functionalities for binding to the LecA lectin from *Pseudomonas aeruginosa* // *ChemistrySelect.* 2017a. V. 2. № 32. P. 10420–10427.

- 15) Angeli A., Li M., Dupin L., Vergoten G., Noel M., Madaoui M., Wang S., Meyer A., Gehin T., Vidal S., Vasseur J.-J., Chevlot Y., Morvan F. Design and synthesis of galactosylated bifurcated ligands with nanomolar affinity for lectin LecA from *Pseudomonas aeruginosa* // ChemBioChem. 2017b. V. 18. № 11. P. 1036-1047.
- 16) Arciola C.R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2015. V. 5. Article 7. Doi: 10.3389/fcimb.2015.00007.
- 17) Avichezer D., Katcoff D.J., Garber N.C., Gilboa-Garber N. Analysis of the amino acid sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic PA-I lectin // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 32. P. 23023–23027.
- 18) Babrowski T., Holbrook C., Moss J., Gottlieb L., Valuckaite V., Zaborin A., Poroyko V., Liu D.C., Zaborina O., Alverdy J.C. *Pseudomonas aeruginosa* virulence expression is directly activated by morphine and is capable of causing lethal gut-derived sepsis in mice during chronic morphine administration // Ann. Surg. 2012. V. 255. № 2. P. 386–393.
- 19) Babushkina I.V., Mamonova I.A., Ulyanov V.Yu., Gladkova E.V., Shpinyak S.P. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* plankton and biofilm forms isolated in implant-associated infection // Bull. Exp. Biol. Med. 2021. V. 172. № 1. P. 46–48.
- 20) Bajolet-Laudinat O., Girod-De Bentzmann S.G., Tournier J.M., Madoulet C., Plotkowski M.C., Chippaux C., Puchelle E. Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture // Infect. Immun. 1994. V. 62. № 10. P. 4481–4487.
- 21) Baker P., Hill P.J., Snarr B.D., Alnabelseya N., Pestrak M.J., Lee M.J., Jennings L.K., Tam J., Melnyk R.A., Parsek M.R., Sheppard D.C., Wozniak D.J., Howell P.L. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Sci. Adv. 2016. V. 2. № 5. Article e1501632. Doi: 10.1126/sciadv.1501632.
- 22) Banar M., Emaneini M., Satarzadeh M., Abdellahi N., Beigverdi R., Van

- Leeuwen W.B., Jabalameli F. Evaluation of mannosidase and trypsin enzymes effects on biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections // PLoS One. 2016. V. 11. № 10. Article e0164622. Doi: 10.1371/journal.pone.0164622.
- 23) Banar M., Emaneini M., Beigverdi R., Fanaei Pirlar R., Node Farahani N., van Leeuwen W.B., Jabalameli F. The efficacy of lyticase and β -glucosidase enzymes on biofilm degradation of *Pseudomonas aeruginosa* strains with different gene profiles // BMC Microbiol. 2019. V. 19. № 291. Article 291. Doi: 10.1186/s12866-019-1662-9.
- 24) Bandara H.M.H.N., Lam O.L.T., Watt R.M., Jin L.J., Samaranyake L.P. Bacterial lipopolysaccharides variably modulate in vitro biofilm formation of *Candida* species // J. Med. Microbiol. 2010. V. 59. № 10. P. 1225–1234.
- 25) Bardelang P., Vankemmelbeke M., Zhang Y., Jarvis H., Antoniadou E., Rochette S., Thomas N.R., Penfold C.N., James R. Design of a polypeptide FRET substrate that facilitates study of the antimicrobial protease lysostaphin // Biochem. J. 2009. V. 418. № 3. P. 615–624.
- 26) Beaudoin T., Yau Y.C.W., Stapleton P.J., Gong Y., Wang P.W., Guttman D.S., Waters V. *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances tobramycin resistance // npj Biofilms Microbiomes. 2017. V. 3. Article 25. Doi:10.1038/s41522-017-0035-0.
- 27) Bendaoud M., Vinogradov E., Balashova N.V, Kadouri D.E., Kachlany S.C., Kaplan J.B. Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide // J. Bacteriol. 2011. V. 193. № 15. P. 3879–3886.
- 28) Bergmann M., Michaud G., Visini R., Jin X., Gillon E., Stocker A., Imberty A., Darbre T., Reymond J.-L. Multivalency effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inhibition and dispersal by glycopeptide dendrimers targeting lectin LecA // Org. Biomol. Chem. 2015. V. 14. № 1. P. 138-148.
- 29) Beukes M., Bierbaum G., Sahl H.-G., Hastings J. W. Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061 // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 1. P. 23–28.

- 30) Bini D., Marchetti R., Russo L., Molinaro A., Silipo A., Cipolla L. Multivalent ligand mimetics of LecA from *P. aeruginosa*: synthesis and NMR studies // Carbohydr. Res. 2016. V. 429. P. 23–28.
- 31) Binte Muhammad Jai H.S., Dam L.C., Tay L.S., Koh J.J.W., Loo H.L., Kline K.A., Goh B.C. Engineered lysins with customized lytic activities against Enterococci and Staphylococci // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Article 574739. Doi: 10.3389/fmicb.2020.574739.
- 32) Blanc D.S., Petignat C., Janin B., Bille J., Francioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study // Clin. Microbiol. Infect. 1998. V. 4. № 5. P. 242–247.
- 33) Blanchard B., Nurisso A., Hollville E., Tétaud C., Wiels J., Pokorná M., Wimmerová M., Varrot A., Imberty A. Structural basis of the preferential binding for globo-series glycosphingolipids displayed by *Pseudomonas aeruginosa* lectin I // J. Mol. Biol. 2008. V. 383. № 4. P. 837–853.
- 34) Borlee B.R., Goldman A.D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D.J., Parsek M.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix // Mol. Microbiol. 2010. V. 75. № 4. P. 827–842.
- 35) Botzenhart K., Döring G. Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* // *Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen, ed. Campa M., Dendonelli M., Friedman H. New York: Springer Science+Business Media. 1993. ISBN 978-1-4613-6324-8. P. 1-18.
- 36) Boukerb A.M., Rousset A., Galanos N., Méar J.-B., Thépaut M., Grandjean T., Gillon E., Cecioni S., Abderrahmen C., Faure K., Redelberger D., Kipnis E., Dessein R., Havet S., Darblade B., Matthews S.E., de Bentzmann S., Guéry B., Cournoyer B., Imberty A., Vidal S. Antiadhesive properties of glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection // J. Med. Chem. 2014. V. 57. № 24. P. 10275–10289.
- 37) Boukerb A.M., Decor A., Ribun S., Tabaroni R., Rousset A., Commin L., Buff

- S., Doléans-Jordheim A., Vidal S., Varrot A., Imberty A., Cournoyer B. Genomic rearrangements and functional diversification of lecA and lecB lectin-coding regions impacting the efficacy of glycomimetics directed against *Pseudomonas aeruginosa* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Article 811. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00811.
- 38) Bragonzi A., Worlitzsch D., Pier G.B., Timpert P., Ulrich M., Hentzer M., Andersen J.B., Givskov M., Conese M., Döring G. Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model // J. Infect. Dis. 2005. V. 192. № 3. P. 410–419.
- 39) Brandel A., Aigal S., Lagies S., Schlimpert M., Meléndez A.V., Xu M., Lehmann A., Hummel D., Fisch D., Madl J., Eierhoff T., Kammerer B., Römer W. The Gb3-enriched CD59/flotillin plasma membrane domain regulates host cell invasion by *Pseudomonas aeruginosa* // Cell. Mol. Life Sci. 2021. V. 78. № 7. P. 3637-3656.
- 40) Brian-Jaisson F., Molmeret M., Fahs A., Guentas-Dombrowsky L., Culioli G., Blache Y., Cérantola S., Ortalo-Magné A. Characterization and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances produced by the marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* strain TC14 // Biofouling. 2016. V. 32. № 5. P. 547–560.
- 41) Browder H.P., Zygmunt W.A., Young J.R., Tavormina P.A. Lysostaphin: enzymatic mode of action // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1965. V. 19. № 3. P. 383–389.
- 42) Bruneau A., Gillon E., Furiga A., Brachet E., Alami M., Roques C., Varrot A., Imberty A., Messaoudi S. Discovery of potent 1,1-diarylthiogalactoside glycomimetic inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* LecA with antibiofilm properties // Eur. J. Med. Chem. 2023, V. 247. Article 115025. Doi: 10.1016/j.ejmech.2022.115025.
- 43) Bulitta J.B., Ly N.S., Yang J.C., Forrest A., Jusko W.J., Tsuji B.T. Development and qualification of a pharmacodynamic model for the pronounced inoculum effect of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. V. 53. № 1. P. 46–56.

- 44) Buzzo J.R., Devaraj A., Gloag E.S., Jurcisek J.A., Robledo-Avila F., Kesler T., Wilbanks K., Mashburn-Warren L., Balu S., Wickham J., Novotny L.A., Stoodley P., Bakaletz L.O., Goodman S.D. Z-form extracellular DNA is a structural component of the bacterial biofilm matrix // *Cell*. 2021. V. 184. № 23. P. 5740-5758.
- 45) Byrd M.S., Sadvovskaya I., Vinogradov E., Lu H., Sprinkle A.B., Richardson S.H., Ma L., Ralston B., Parsek M.R., Anderson E.M., Lam J.S., Wozniak D.J. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 73. № 4. P. 622–638.
- 46) Cecioni S., Lalor R., Blanchard B., Praly J.-P., Imberty A., Matthews S.E., Vidal S. Achieving high affinity towards a bacterial lectin through multivalent topological isomers of calix[4]arene glycoconjugates // *Chemistry*. 2009. V. 15. № 47. P. 13232–13240.
- 47) Cecioni S., Faure S., Darbost U., Bonnamour I., Parrot-Lopez H., Roy O., Taillefumier C., Wimmerová M., Praly J.-P., Imberty A., Vidal S. Selectivity among two lectins: probing the effect of topology, multivalency and flexibility of «clicked» multivalent glycoclusters // *Chemistry*. 2011a. V. 17. № 7. P. 2146–2159.
- 48) Cecioni S., Oerthel V., Iehl J., Holler M., Goyard D., Praly J.-P., Imberty A., Nierengarten J.-F., Vidal S. Synthesis of dodecavalent fullerene-based glycoclusters and evaluation of their binding properties towards a bacterial lectin // *Chemistry*. 2011b. V. 17. № 11. P. 3252–3261.
- 49) Cecioni S., Praly J.-P., Matthews S. E., Wimmerová M., Imberty A., Vidal S. Rational design and synthesis of optimized glycoclusters for multivalent lectin-carbohydrate interactions: influence of the linker arm // *Chemistry*. 2012. V. 18. № 20. P. 6250–6263.
- 50) Ceotto-Vigoder H., Marques S.L.S., Santos I.N.S., Alves M.D.B., Barrias E.S., Potter A., Alviano D.S., Bastos M.C.F. Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis // *J. Appl. Microbiol.* 2016. V. 121. № 1. P. 101–114.
- 51) Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A. The calgary

- biofilm device : new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms // J. Clin. Microbiol. 1999. V. 37. № 6. P. 1771-1776.
- 52) Černohorská L., Votava M. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* // Folia Microbiol. (Praha). 2008. V. 53. № 1. P. 57–60.
- 53) Chabre Y.M., Giguère D., Blanchard B., Rodrigue J., Rocheleau S., Neault M., Rauthu S., Papadopoulos A., Arnold A.A, Imberty A., Roy R. Combining glycomimetic and multivalent strategies toward designing potent bacterial lectin inhibitors // Chemistry. 2011. V. 17. № 23. P. 6545–6562.
- 54) Chan B.K., Abedon S.T. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control // Curr. Pharm. Des. 2015. V. 21. № 1. P. 85–99.
- 55) Chemani C., Imberty A., de Bentzmann S., Pierre M., Wimmerová M., Guery B. P., Faure K. Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa* -induced lung injury and effect of carbohydrate ligands // Infect. Immun. 2009. V. 77. № 5. P. 2065–2075.
- 56) Chen C., Fan H., Huang Y., Peng F., Fan H., Yuan S., Tong Y. Recombinant lysostaphin protects mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia // Biomed Res. Int. 2014. V. 2014(1). Article 602185. Doi: 10.1155/2014/602185.
- 57) Chen C.P., Song S.C., Gilboa-Garber N., Chang K.S., Wu A.M. Studies on the binding site of the galactose-specific agglutinin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa* // Glycobiology. 1998. V. 8. № 1. P. 7–16.
- 58) Chen F., Zhang J., Ji H.J., Kim M.K., Kim K.W., Choi J.II, Han S.H., Lim S., Seo H.S., Ahn K.B. *Deinococcus radiodurans* exopolysaccharide inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Article 712086. Doi: 10.3389/fmicb.2021.712086.
- 59) Chen P., Abercrombie J.J., Jeffrey N.R., Leung K.P. An improved medium for growing *Staphylococcus aureus* biofilm // J. Microbiol. Methods. 2012. V. 90. № 2. P. 115–118.
- 60) Chopra S., Harjai K., Chhibber S. Potential of sequential treatment with

- minocycline and *S. aureus* specific phage lysin in eradication of MRSA biofilms: an in vitro study // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. № 7. P. 3201–3210.
- 61) Cioci G., Mitchell E.P., Gautier C., Wimmerová M., Sudakevitz D., Pérez S., Gilboa-Garber N., Imberty A. Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa* // *FEBS Lett.* 2003. V. 555. № 2. P. 297–301.
- 62) Ciofu O., Tolker-Nielsen T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents — how *P. aeruginosa* can escape antibiotics // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Article 913. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00913.
- 63) Colvin K.M., Gordon V.D., Murakami K., Borlee B.R., Wozniak D.J., Wong G.C.L., Parsek M.R. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa* // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7. № 1. Article e1001264. Doi: 10.1371/journal.ppat.1001264.
- 64) Colvin K.M., Irie Y., Tart C.S., Urbano R., Whitney J.C., Ryder C., Howell P.L., Wozniak D.J., Parsek M.R. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. № 8. P. 1913–1928.
- 65) Costerton J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // *Science.* 1999. V. 284. № 5418. P. 1318–1322.
- 66) Coulthurst S. The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon // *Microbiol. (United Kingdom).* 2019. V. 165. № 5. P. 503–515.
- 67) Crabbé A., Jensen P.Ø., Bjarnsholt T., Coenye T. Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms // *Trends Microbiol.* 2019. V. 27. № 10. P. 850–863.
- 68) Cramton S.E., Gerke C., Schnell N.F., Nichols W.W., Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 10. P. 5427–5433.
- 69) Crosby H.A., Kwiecinski J., Horswill A.R. *Staphylococcus aureus* aggregation

- and coagulation mechanisms, and their function in host–pathogen interactions // *Adv. Appl. Microbiol.* 2016. V. 96. P. 1–41.
- 70) Csávás M., Kalmár L., Szőke P., Farkas L.B., Bécsi B., Kónya Z., Kerékgyártó J., Borbás A., Erdódi F., Kövér K.E. A fucosylated lactose-presenting tetravalent glycocluster acting as a mutual ligand of *Pseudomonas aeruginosa* lectins A (PA-IL) and B (PA-IIL)—synthesis and interaction studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. Article 16194. Doi: 10.3390/ijms232416194.
- 71) Daboor S.M., Raudonis R., Cohen A., Rohde J.R., Cheng Z. Marine bacteria, a source for alginolytic enzyme to disrupt *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. № 5. Article 307. Doi: 10.3390/md17050307.
- 72) Dajcs J.J., Hume E.B.H., Moreau J.M., Caballero A.R., Cannon B.M., O’Callaghan R.J. Lysostaphin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in the rabbit // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. V. 41. № 6. P. 1432–1437.
- 73) Dajcs J.J., Thibodeaux B.A., Hume E.B.H., Zheng X., Sloop G.D., O’Callaghan R.J. Lysostaphin is effective in treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endophthalmitis in the rabbit // *Curr. Eye Res.* 2001. V. 22. № 6. P. 451–457.
- 74) Dam T.K., Brewer C.F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 2. P. 387–429.
- 75) Dam T.K., Brewer C.F. Multivalent lectin-carbohydrate interactions energetics and mechanisms of binding // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 2010. V. 63. № 10. P. 139–64.
- 76) Desbois A.P., Coote P.J. Bactericidal synergy of lysostaphin in combination with antimicrobial peptides. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011. V. 30. № 8. P. 1015–1021.
- 77) Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S. R., Worrall K. E., Cámara M., Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-

- dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 50. № 1. P. 29–43.
- 78) Diggle S.P., Stacey R.E., Dodd C., Cámara M., Williams P., Winzer K. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. № 6. P. 1095–104.
- 79) Doghri I., Lavaud J., Dufour A., Bazire A., Lanneluc I., Sablé S. Cell-bound exopolysaccharides from an axenic culture of the intertidal mudflat *Navicula phyllepta* diatom affect biofilm formation by benthic bacteria // *J. Appl. Phycol.* 2017. V. 29. № 1. P. 165–177.
- 80) Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. V. 15. № 2. P. 167–193.
- 81) Donnier-Maréchal M., Galanos N., Grandjean T., Pascal Y., Ji D.-K., Dong L., Gillon E., He X.-P., Imberty A., Kipnis E., Dessein R., Vidal S. Perylenediimide-based glycoclusters as high affinity ligands of bacterial lectins: synthesis, binding studies and anti-adhesive properties // *Org. Biomol. Chem.* 2017. V. 15, № 47. P. 10037-10043.
- 82) Duan X., Huang X., Wang X., Yan S., Guo S., Abdalla A.E., Huang C., Xie J. L-serine potentiates fluoroquinolone activity against *Escherichia coli* by enhancing endogenous reactive oxygen species production // *J. Antimicrob. Chemother.* 2016. V. 71. № 8. P. 2192–2199.
- 83) Eierhoff T., Bastian B., Thuenauer R., Madl J., Audfray A., Aigal S., Juillot S., Rydell G.E., Müller S., de Bentzmann S., Imberty A., Fleck C., Römer C. A lipid zipper triggers bacterial invasion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. V. 111. № 35. P. 12895–12900.
- 84) Fleming D., Chahin L., Rumbaugh K. Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017. V. 61. № 2. Article e01998-16. Doi: 10.1128/AAC.01998-16.
- 85) Fleming D., Rumbaugh K. The consequences of biofilm dispersal on the host

// Sci. Rep. 2018. V. 8. Article 10738. Doi:10.1038/s41598-018-29121-2.

- 86) Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. № 9. P. 623–633.
- 87) Flockton T., Schnorbus L., Araujo A., Adams J., Hammel M., Perez L. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with surface modified polymeric nanoparticles // Pathogens. 2019. V. 8. № 2. Article 55. Doi: 10.3390/pathogens8020055.
- 88) Foulston L., Elsholz A.K.W., DeFrancesco A.S., Losick R. The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH // MBio. 2014. V. 5. № 5. Article e01667-14. Doi: 10.1128/mbio.01667-14.
- 89) Garber N., Guempel U., Belz A., Gilboa-Garber N., Doyle R.J. On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1116. № 3. P. 331–333.
- 90) Gening M.L., Titov D.V, Cecioni S., Audfray A., Gerbst A.G., Tsvetkov Y.E., Krylov V.B., Imberty A., Nifantiev N.E., Vidal S. Synthesis of multivalent carbohydrate-centered glycoclusters as nanomolar ligands of the bacterial lectin LecA from *Pseudomonas aeruginosa* // Chemistry. 2013. V. 19. № 28. P. 9272–9285.
- 91) George A.M., Jones P.M., Middleton P.G. Cystic fibrosis infections: Treatment strategies and prospects // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 300. № 2. P. 153–164.
- 92) Geredew Kifelew L., Mitchell J.G., Speck P. Mini-review: efficacy of lytic bacteriophages on multispecies biofilms // Biofouling. 2019. V. 35. № 4. P. 472–481.
- 93) Gerland B., Goudot A., Ligeour C., Pourceau G., Meyer A., Vidal S., Gehin T., Vidal O., Souteyrand E., Vasseur J.J., Chevlot Y., Morvan F. Structure binding relationship of galactosylated glycoclusters toward *Pseudomonas aeruginosa* lectin leca using a DNA-based carbohydrate microarray // Bioconjug. Chem. 2014. V. 25.

P. 379–392.

- 94) Gerstmans H., Criel B., Briers Y. Synthetic biology of modular endolysins // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. № 3. P. 624–640.
- 95) Gilboa-Garber N. Inhibition of broad spectrum hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* by D-galactose and its derivatives // *FEBS Lett.* 1972. V. 20. № 2. P. 242–244.
- 96) Gilboa-Garber N. *Pseudomonas aeruginosa* lectins // *Methods Enzymol.* 1982. V. 83. № 1980. P. 378–85.
- 97) Gilboa-Garber N., Sudakevitz D., Sheffi M., Sela R., Levene C. PA-I and PA-II lectin interactions with the ABO(H) and P blood group glycosphingolipid antigens may contribute to the broad spectrum adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tissues in secondary infections // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11. № 5. P. 414–417.
- 98) Gilmore B.F., Flynn P.B., O'Brien S., Hickok N., Freeman T., Bourke P. Cold plasmas for biofilm control: opportunities and challenges // *Trends Biotechnol.* 2018. V. 36. № 6. P. 627–638.
- 99) Gonzalez-Delgado L.S., Walters-Morgan H., Salamaga B., Robertson A.J., Hounslow A.M., Jagielska E., Sabała I., Williamson M.P., Lovering A.L., Mesnage S. Two-site recognition of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan by lysostaphin SH3b // *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 16. № 1. P. 24–30.
- 100) Goyard D., Thomas B., Gillon E., Imberty A., Renaudet O. Heteroglycoclusters with dual nanomolar affinities for the lectins LecA and LecB from *Pseudomonas aeruginosa* // *Front. Chem.* 2019. V. 7. Article 666. Doi: 10.3389/fchem.2019.00666.
- 101) Grishin A.V., Karyagina A.S., Vasina D.V., Vasina I.V., Gushchin V.A., Lunin V.G. Resistance to peptidoglycan-degrading enzymes // *Crit. Rev. Microbiol.* 2020. V. 46. № 6. P. 703–726.
- 102) Grishin A.V., Shestak N.V., Lavrova N.V., Lyashchuk A.M., Popova L.I., Strukova N.V., Generalova M.S., Ryazanova A.V., Polyakov N.B., Galushkina Z.M., Soboleva L.A., Boksha I.S., Karyagina A.S., Lunin V.G. Fusion of lysostaphin to an

- albumin binding domain prolongs its half-life and bactericidal activity in the systemic circulation // *Molecules*. 2019. V. 24. № 16. Article 2892. Doi: 10.3390/molecules24162892.
- 103) Grishin A.V., Konstantinova S.V., Vasina I.V., Shestak N.V., Karyagina A.S., Lunin V.G. A simple protocol for the determination of lysostaphin enzymatic activity // *Antibiotics*. 2020b. V. 9. № 12. Article 917. Doi: 10.3390/antibiotics9120917.
- 104) Guo Y., Song G., Sun M., Wang J., Wang Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus* // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020. V. 10. Article 107. Doi: 10.3389/fcimb.2020.00107.
- 105) Gustke H., Kleene R., Loers G., Nehmann N., Jaehne M., Bartels K.-M., Jaeger K.-E., Schachner M., Schumacher U. Inhibition of the bacterial lectins of *Pseudomonas aeruginosa* with monosaccharides and peptides // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. V. 31. № 2. P. 207–215.
- 106) Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. V. 2. № 2. P. 95–108.
- 107) Harmsen M., Yang L., Pamp S.J., Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010. V. 59. № 3. P. 253–268.
- 108) Haussler S. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection // *J. Med. Microbiol.* 2003. V. 52. № 4. P. 295–301.
- 109) Hickey C., Schaible B., Nguyen S., Hurley D., Srikumar S., Fanning S., Brown E., Crifo B., Matallanas D., McClean S. Taylor C.T., Schaffer K. Increased virulence of bloodstream over peripheral isolates of *P. aeruginosa* identified through post-transcriptional regulation of virulence factors // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018. V. 8. Article 357. Doi: 10.3389/fcimb.2018.00357.
- 110) Hill D., Rose B., Pajkos A., Robinson M., Bye P., Bell S., Elkins M., Thompson B., MacLeod C., Aaron S.D., Harbour C. Antibiotic susceptibility of

- Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. № 10. P. 5085–5090.
- 111) Hiramatsu Y., Saito M., Otsuka N., Suzuki E., Watanabe M., Shibayama K., Kamachi K. BipA is associated with preventing autoagglutination and promoting biofilm formation in *Bordetella holmesii* // PLoS One. 2016. V. 11. № 7. Article e0159999. Doi: 10.1371/journal.pone.0159999.
- 112) Hogan S., Zapotoczna M., Stevens N.T., Humphreys H., O’Gara J.P., O’Neill E. Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections // J. Hosp. Infect. 2017. V. 96. № 2. P. 177–182.
- 113) Houston P., Rowe S.E., Pozzi C., Waters E.M., O’Gara J.P. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype // Infect. Immun. 2011. V. 79. № 3. P. 1153–1165.
- 114) Hu X., Huang Y.-Y., Wang Y., Wang X., Hamblin M.R. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Article 1299. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01299.
- 115) Hu Y., Beshr G., Garvey C.J., Tabor R.F., Titz A., Wilkinson B.L. Photoswitchable janus glycodendrimer micelles as multivalent inhibitors of LecA and LecB from *Pseudomonas aeruginosa* // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2017. V. 159. P. 605-612.
- 116) Huang S.-F., Lin C.-H., Lai Y.-T., Tsai C.-L., Cheng T.-J.R., Wang S.-K. Development of *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA inhibitors using bivalent galactosides supported on polyproline peptide scaffolds // Chem. - An Asian J. 2018. V. 13. № 6. P. 686-700.
- 117) Imberty A., Wimmerová M., Mitchell E.P., Gilboa-Garber N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition // Microbes Infect. 2004. V. 6. № 2. P. 221–228.
- 118) Itoh Y., Wang X., Hinnebusch B.J., Preston J.F., Romeo T. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial

- biofilms // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 1. P. 382–387.
- 119) Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 2. P. 470–476.
- 120) Jayakumar J., Vinod V., Arumugam T., Sathy B. N., Biswas L., Kumar V.A., Biswas R. Efficacy of Lysostaphin functionalized silicon catheter for the prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 256. Article 128547. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128547.
- 121) Jennings L.K., Storek K.M., Ledvina H.E., Coulon C., Marmont L.S., Sadovskaya I., Secor P.R., Tseng B.S., Scian M., Filloux A., Wozniak D.J., Howell P.L., Parsek M.R. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. V. 112. № 36. P. 11353-11358.
- 122) Jiang P., Li J., Han F., Duan G., Lu X., Gu Y., Yu W. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101 // PLoS One. 2011. V. 6. № 4. Article e18514. Doi: 10.1371/journal.pone.0018514.
- 123) Johansson E.M.V, Cruz S.A, Kolomiets E., Buts L., Kadam R.U., Cacciarini M., Bartels K.-M., Diggle S.P., Cámara M., Williams P., Loris R., Nativi C., Rosenau F., Jaeger K.-E., Darbre T., Reymond J.-L. Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB // Chem. Biol. 2008. V. 15. № 12. P. 1249–1257.
- 124) Johnson C.T., Wroe J.A., Agarwal R., Martin K.E., Guldberg R.E., Donlan R.M., Westblade L.F., García A.J. Hydrogel delivery of lysostaphin eliminates orthopedic implant infection by *Staphylococcus aureus* and supports fracture healing. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2018. V. 115. № 22. P. E4960–E4969. Doi: 10.1073/pnas.1801013115.
- 125) Kadam R.U., Bergmann M., Hurley M., Garg D., Cacciarini M., Swiderska M.A, Nativi C., Sattler M., Smyth A.R., Williams P., Cámara M., Stocker A., Darbre T., Reymond J.-L. A Glycopeptide dendrimer inhibitor of the galactose-specific lectin

- LecA and of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2011. V. 50. № 45. P. 10631–10635.
- 126) Kadam R.U., Garg D., Schwartz J., Visini R., Sattler M., Stocker A., Darbre T., Reymond J.-L. CH- π «T-shape» interaction with histidine explains binding of aromatic galactosides to *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA // *ACS Chem. Biol.* 2013a. V. 8. № 9. P. 1925–1930.
- 127) Kadam R.U., Bergmann M., Garg D., Gabrieli G., Stocker A., Darbre T., Reymond J.-L. Structure-based optimization of the terminal tripeptide in glycopeptide dendrimer inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms targeting LecA // *Chemistry*. 2013b. V. 19. № 50. P. 17054–17063.
- 128) Kalia V.C. Quorum sensing inhibitors: An overview // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. № 2. P. 224–245.
- 129) Kanmani P., Satish Kumar R., Yuvaraj N., Paari K.A., Pattukumar V., Arul V. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro // *Bioresour. Technol.* 2011. V. 102. № 7. P. 4827–4833.
- 130) Kanmani P., Suganya K., Satish Kumar R., Yuvaraj N., Pattukumar V., Paari K.A., Arul V. Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of fish // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013. V. 169. № 3. P. 1001–1015.
- 131) Karwacki M.T., Kadouri D.E., Bendaoud M., Izano E.A., Sampathkumar V., Inzana T.J., Kaplan J.B. Antibiofilm activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 capsular polysaccharide // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. Article e63844. Doi: 10.1371/journal.pone.0063844.
- 132) Kavita K., Singh V.K., Mishra A., Jha B. Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis* // *Carbohydr. Polym.* 2014. V. 101. № 1. P. 29–35.
- 133) Keller A.P., Huemer M., Chang C., Mairpady Shambat S., Bjurnemark C., Oberortner N., Santschi M.V., Zinsli L.V., Röhrig C., Sobieraj A.M., Shen Y.,

- Eichenseher F., Zinkernagel A.S., Loessner M.J., Schmelcher M. Systemic application of bone-targeting peptidoglycan hydrolases as a novel treatment approach for staphylococcal bone infection // *MBio*. 2023. V. 14. № 5. Article e0183023. Doi: 10.1128/mbio.01830-23.
- 134) Khan S., Tøndervik A., Sletta H., Klinkenberg G., Emanuel C., Onsøyen E., Myrvold R., Howe R.A., Walsh T.R., Hill K.E., Thomas D.W. Overcoming drug resistance with alginate oligosaccharides able to potentiate the action of selected antibiotics // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. № 10. P. 5134–5141.
- 135) Kiedrowski M.R., Kavanaugh J.S., Malone C.L., Mootz J.M., Voyich J.M., Smeltzer M.S., Bayles K.W., Horswill A.R. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 11. Article e26714. Doi: 10.1371/journal.pone.0026714.
- 136) Kim Y., Oh S., Kim S.H. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 379. № 2. P. 324–329.
- 137) Kirkeby S., Hansen A.K., d'Apice A., Moe D. The galactophilic lectin (PA-IL, gene LecA) from *Pseudomonas aeruginosa*. Its binding requirements and the localization of lectin receptors in various mouse tissues // *Microb. Pathog.* 2006. V. 40. № 5. P. 191–197.
- 138) Kirkeby S., Wimmerová M., Moe D., Hansen A.K. The mink as an animal model for *Pseudomonas aeruginosa* adhesion: binding of the bacterial lectins (PA-IL and PA-III) to neoglycoproteins and to sections of pancreas and lung tissues from healthy mink // *Microbes Infect.* 2007. V. 9. № 5. P. 566–573.
- 139) Kokai-Kun J.F., Walsh S.M., Chanturiya T., Mond J.J. Lysostaphin cream eradicates *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a cotton rat model // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. V. 47. № 5. P. 1589–1597.
- 140) Kokai-Kun J.F. Lysostaphin: a silver bullet for staph. // *Antimicrobial drug discovery: emerging strategies*. Wallingford: CABI, 2012. P. 147–165.
- 141) Kokai-Kun J.F., Chanturiya T., Mond J.J. Lysostaphin as a treatment for

- systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 60. № 5. P. 1051–1059.
- 142) Kokai-Kun J.F., Chanturiya T., Mond J.J. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice // J. Antimicrob. Chemother. 2009. V. 64. № 1. P. 94–100.
- 143) Konstantinova S., Grishin A., Lyashchuk A., Vasina I., Karyagina A., Lunin V. Influence of NaCl and pH on lysostaphin catalytic activity, cell binding, and bacteriolytic activity // Appl Microbiol Biotechnol. 2022. V. 106. № 19. P. 6519–6534.
- 144) Koo H., Allan R. N., Howlin R.P., Stoodley P., Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies // Nat. Rev. Microbiol. 2017. V. 15. № 12. P. 740-755.
- 145) Kovach K.N.; Fleming D.; Wells M.J.; Rumbaugh K.P.; Gordon V.D. Specific disruption of established *P. aeruginosa* biofilms using polymer-attacking enzymes // Langmuir. 2020. V. 36. № 6. P. 1585-1595.
- 146) 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. Article 177. Doi: 10.3390/pathogens12020177.
- 147) Kuhaudomlarp S., Siebs E., Shanina E., Topin J., Joachim I., Silva Figueiredo Celestino Gomes P., Varrot A., Rognan D., Rademacher C., Imberty A., Titz A. Non-carbohydrate glycomimetics as inhibitors of calcium(II)-binding lectins // Angew. Chemie Int. Ed. 2021. V. 60. № 15. P. 8104–8114.
- 148) Kusuma C.M., Kokai-Kun J.F. Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of *Staphylococcus aureus* // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. № 8. P. 3256–3263.
- 149) Kwiecinski J., Peetermans M., Liesenborghs L., Na M., Björnsdottir H., Zhu X., Jacobsson G., Johansson B.R., Geoghegan J.A., Foster T.J., Josefsson E., Bylund J., Verhamme P., Jin T. Staphylokinase control of *Staphylococcus aureus* biofilm

- formation and detachment through host plasminogen activation // *J. Infect. Dis.* 2016. V. 213. № 1. P. 139–148.
- 150) Lanne B., Ciopraga J., Bergström J., Motas C., Karlsson K. Binding of the galactose-specific *Pseudomonas aeruginosa* lectin, PA-I, to glycosphingolipids and other glycoconjugates // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11. № 4. P. 292–298.
- 151) Latka A., Maciejewska B., Majkowska-Skrobek G., Briers Y., Drulis-Kawa Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. № 8. P. 3103–3119.
- 152) Laughlin R.S., Musch M.W., Hollbrook C.J., Rocha F.M., Chang E.B., Alverdy J.C. The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis // *Ann. Surg.* 2000. V. 232. № 1. P. 133–42.
- 153) Lee J.H., Kim Y.G., Lee J. Thermostable xylanase inhibits and disassembles *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Biofouling.* 2018. V. 34. № 3. P. 346–356.
- 154) Lee J., Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* // *Protein Cell.* 2014. V. 6. № 1. P. 26–41.
- 155) Lee K.-J., Lee M.-A., Hwang W., Park H., Lee K.-H. Deacylated lipopolysaccharides inhibit biofilm formation by Gram-negative bacteria // *Biofouling.* 2016. V. 32. № 7. P. 711–723.
- 156) Lesouhaitier O., Feuilloley M. Are opportunistic pathogens able to sense the weakness of host through specific detection of human hormone? // *J. Bacteriol. Parasitol.* 2012. V. 3. № 6. Article e106. Doi: 10.4172/2155-9597.1000e106.
- 157) Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. № 1. P. 48–56.
- 158) Li J., Zhang K., Ruan L., Chin S. F., Wickramasinghe N., Liu H., Ravikumar V., Ren J., Duan H., Yang L., Chan-Park M. B. Block copolymer nanoparticles remove biofilms of drug-resistant gram-positive bacteria by nanoscale bacterial debridement // *Nano Lett.* 2018a. V. 18. № 7. P. 4180–4187.
- 159) Li J., Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their

- interaction mechanism with bacteria: current state and perspectives // Eur. Polym. J. 2020. V. 138. Article 109984. Doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109984.
- 160) Li W., Ji J., Rui X., Yu J., Tang W., Chen X., Jiang M., Dong M. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro // LWT - Food Sci. Technol. 2014. V. 59. № 2P1. P. 732–739.
- 161) Li W., Yang H., Gong Y., Wang S., Li Y., Wei H. Effects of a chimeric lysin against planktonic and sessile *Enterococcus faecalis* hint at potential application in endodontic therapy // Viruses. 2018b. V. 10. № 6. Article 290. Doi: 10.3390/v10060290.
- 162) Li Y., Li Q., Hao D., Jiang D., Luo Y., Liu Y., Zhao Z. Production, purification, and antibiofilm activity of a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter* sp. B4 // Prep. Biochem. Biotechnol. 2015. V. 45. № 2. P. 192–204.
- 163) Liesenborghs L., Verhamme P., Vanassche T. *Staphylococcus aureus*, master manipulator of the human hemostatic system // J. Thromb. Haemost. 2018. V. 16. № 3. P. 441–454.
- 164) Ligeour C., Vidal O., Dupin L., Casoni F., Gillon E., Meyer A., Vidal S., Vergoten G., Lacroix J.-M., Souteyrand E., Imberty A., Vasseur J.-J., Chevolut Y., Morvan F. Mannose-centered aromatic galactoclusters inhibit the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* // Org. Biomol. Chem. 2015a. V. 13. № 31. P. 8433–8444.
- 165) Ligeour C., Dupin L., Angeli A., Vergoten G., Vidal S., Meyer A., Souteyrand E., Vasseur J.-J., Chevolut Y., Morvan F. Importance of topology for glycocluster binding to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia ambifaria* bacterial lectins // Org. Biomol. Chem. 2015b. V. 13. № 46. P. 11244–11254.
- 166) Liu J., Yang L., Kjellerup B.V., Xu Z. Viable but nonculturable (VBNC) state, an underestimated and controversial microbial survival strategy // Trends Microbiol. 2023. V. 31. № 10. P. 1013–1023.
- 167) Liu Y., Li R., Xiao X., Wang Z. Bacterial metabolism-inspired molecules to modulate antibiotic efficacy // J. Antimicrob. Chemother. 2019. V. 74. № 12. P.

- 3409-3417.
- 168) Liu Y., Gloag E.S., Hill P.J., Parsek M.R., Wozniak D.J. Interbacterial antagonism mediated by a released polysaccharide // *J. Bacteriol.* 2022. V. 204. № 5. Article e00076-22. Doi: 10.1128/jb.00076-22.
- 169) Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 339. № 8. P. 520–532.
- 170) Lu T.K., Collins J.J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 27. P. 11197–11202.
- 171) Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist // *Microbes Infect.* 2000. V. 2. № 9. P. 1051–1060.
- 172) Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M.R., Bayles K., Wozniak D.J. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 3. Article e1000354. Doi: 10.1371/journal.ppat.1000354.
- 173) Ma L., Wang S., Wang D., Parsek M.R., Wozniak D.J. The roles of biofilm matrix polysaccharide Psl in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012. V. 65. № 2. P. 377–380.
- 174) Mah T.-F. Biofilm-specific antibiotic resistance // *Future Microbiol.* 2012. V. 7. № 9. P. 1061–1072.
- 175) Mah T.-F. Establishing the minimal bactericidal concentration of an antimicrobial agent for planktonic cells (MBC-P) and biofilm cells (MBC-B) // *J. Vis. Exp.* 2014. V. 83. Article e50854. Doi: 10.3791/50854.
- 176) Malinovská L., Le S.T., Herczeg M., Vašková M., Houser J., Fujdiarová E., Komárek J., Hodek P., Borbás A., Wimmerová M., Csávás M. Synthesis of β -d-galactopyranoside-presenting glycoclusters, investigation of their interactions with *Pseudomonas aeruginosa* lectin a (PA-IL) and evaluation of their anti-adhesion potential // *Biomolecules.* 2019. V. 9. № 11. Article 686. Doi: 10.3390/biom9110686.
- 177) Mandell J.B., Orr S., Koch J., Nourie B., Ma D., Bonar D. D., Shah N., Urish

- K.L. Large variations in clinical antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms of periprosthetic joint infection isolates // J. Orthop. Res. 2019. V. 37. № 7. P. 1604–1609.
- 178) Mann E.E., Wozniak D.J. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology // FEMS Microbiol. Rev. 2012. V. 36. № 4. P. 893–916.
- 179) Masters E.A., Trombetta R.P., de Mesy Bentley K.L., Boyce B.F., Gill A.L., Gill S.R., Nishitani K., Ishikawa M., Morita Y., Ito H., Bello-Irizarry S.N., Ninomiya M., Brodell J.D., Lee C.C., Hao S.P., Oh I., Xie C., Awad H.A., Daiss J.L., Owen J.R., Kates S.L., Schwarz E.M., Muthukrishnan G. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy” // Bone Res. 2019. V. 7. № 1. Article 20. Doi: 10.1038/s41413-019-0061-z.
- 180) Le Mauff F., Razvi E., Reichhardt C., Sivarajah P., Parsek M.R., Howell P.L., Sheppard D.C. The Pel polysaccharide is predominantly composed of a dimeric repeat of α -1,4 linked galactosamine and N-acetylgalactosamine // Commun. Biol. 2022. V. 5. Article 502. Doi: 10.1038/s42003-022-03453-2.
- 181) McCarthy H., Rudkin J.K., Black N. S., Gallagher L., O’Neill E., O’Gara J. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus* // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2015. V. 5. Article 1. Doi: 10.3389/fcimb.2015.00001.
- 182) Meiers J., Zahorska E., Röhrig T., Hauck D., Wagner S., Titz A. Directing drugs to bugs: antibiotic-carbohydrate conjugates targeting biofilm-associated lectins of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Med. Chem. 2020. V. 63. № 20. P. 11707-11724.
- 183) Meiers J., Rox K., Titz A. Lectin-targeted prodrugs activated by *Pseudomonas aeruginosa* for self-destructive antibiotic release // J. Med. Chem. 2022. V. 65. № 20. P. 13988–14014.
- 184) Meireles A., Borges A., Giaouris E., Simões M. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry // Food Res. Int. 2016. V. 86. P. 140–146.
- 185) Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J.,

- Glupczynski Y., Van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P. M., Van Bambeke F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium // Clin. Microbiol. Infect. 2007. V. 13. № 6. P. 560–578.
- 186) Metelkina O., Huck B., O'Connor J.S., Koch M., Manz A., Lehr C. M., Titz A. Targeting extracellular lectins of *Pseudomonas aeruginosa* with glycomimetic liposomes // J. Mater. Chem. B. 2022. V. 10. № 4. P. 537–548.
- 187) Mewe M., Tielker D., Schönberg R., Schachner M., Jaeger K.-E., Schumacher U. *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia // J. Laryngol. Otol. 2005. V. 119. № 8. P. 595–599.
- 188) Meyer K.J., Taylor H.B., Seidel J., Gates M.F., Lewis K. Pulse dosing of antibiotic enhances killing of a *Staphylococcus aureus* biofilm // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Article 596227. Doi: 10.3389/fmicb.2020.596227.
- 189) Mi G., Shi D., Wang M., Webster T.J. Reducing bacterial infections and biofilm formation using nanoparticles and nanostructured antibacterial surfaces // Adv. Healthc. Mater. 2018. V. 7. Article 1800103. Doi: 10.1002/adhm.201800103.
- 190) Mitkowski P., Jagielska E., Nowak E., Bujnicki J. M., Stefaniak F., Niedzialek D., Bochtler M., Sabała I. Structural bases of peptidoglycan recognition by lysostaphin SH3b domain // Sci. Rep. 2019. V. 9. Article 5965. Doi: 10.1038/s41598-019-42435-z.
- 191) Mohamed S.H., Mohamed M.S.M., Khalil M.S., Mohamed W.S., Mabrouk M.I. Antibiofilm activity of papain enzyme against pathogenic *Klebsiella pneumoniae* // J. Appl. Pharm. Sci. 2018. V. 8. № 6. P. 163–168.
- 192) Moskowitz S.M., Foster J.M., Emerson J., Burns J.L. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. № 5. P. 1915–1922.
- 193) Müsken M., Pawar V., Schwebs T., Bähre H., Felgner S., Weiss S., Häussler S. Breaking the vicious cycle of antibiotic killing and regrowth of biofilm-residing *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. 2018. V. 62. № 12.

- 194) Nahar S., Mizan M. F. R., Ha A. J., Ha S.-D. Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2018. V. 17. № 6. P. 1484–1502.
- 195) Nair S., Desai S., Poonacha N., Vipra A., Sharma U. Antibiofilm activity and synergistic inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms by bactericidal protein P128 in combination with antibiotics // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7280–7289.
- 196) Nilsen T., Nes I.F., Holo H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 5. P. 2975–2984.
- 197) Novotny L.A., Juncisek J.A., Goodman S.D., Bakaletz L.O. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms in vitro and induce bacterial clearance in vivo // *EBioMedicine.* 2016. V. 10. P. 33–44.
- 198) Nurisso A., Blanchard B., Audfray A., Rydner L., Oscarson S., Varrot A., Imberty A. Role of water molecules in structure and energetics of *Pseudomonas aeruginosa* lectin I interacting with disaccharides // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 26. P. 20316–20327.
- 199) O’Neill E., Pozzi C., Houston P., Smyth D., Humphreys H., Robinson D.A., O’Gara J.P. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections // *J. Clin. Microbiol.* 2007. V. 45. № 5. P. 1379–1388.
- 200) Oliveira H., São-José C., Azeredo J. Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: Challenges and future prospects for in vivo therapy // *Viruses.* 2018. V. 10. № 6. Article 292. Doi: 10.3390/v10060292.
- 201) Olsen N.M.C., Thiran E., Hasler T., Vanzielegem T., Belibasakis G.N., Mahillon J., Loessner M.J., Schmelcher M. Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase // *Viruses.* 2018. V. 10.

- № 8. Article 438. Doi: 10.3390/v10080438.
- 202) Oluola O., Kong L., Fein M., Weisman L.E. Lysostaphin in treatment of neonatal *Staphylococcus aureus* infection. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. V. 51. № 6. P. 2198–2200.
- 203) O'Reilly C., Blasco S., Parekh B., Collins H., Cooke G., Gunnlaugsson T., Byrne J.P. Ruthenium-centred btp glycoclusters as inhibitors for: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation // *RSC Adv.* 2021. V. 11. № 27. P. 16318–16325.
- 204) O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay // *J. Vis. Exp.* 2011. № 47. Article 2437. Doi: 10.3791/2437.
- 205) O'Toole G.A., Ha D. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review // *Microbiol. Spectr.* 2015. V. 3. Iss. 2. Article 10.1128/microbiolspec.mb-0003-2014. Doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014.
- 206) Otsuka I., Blanchard B., Borsali R., Imberty A., Kakuchi T. Enhancement of plant and bacterial lectin binding affinities by three-dimensional organized cluster glycosides constructed on helical poly(phenylacetylene) backbones // *ChemBioChem.* 2010. V. 11. № 17. P. 2399–2408.
- 207) Otto M. Staphylococcal Biofilms // *Microbiol. Spectr.* 2018. T. 6. № 4. P. 699–711.
- 208) Palmioli A., Sperandio P., Polissi A., Airoidi C. Targeting bacterial biofilm: a new LecA multivalent ligand with inhibitory activity // *ChemBioChem.* 2019. V. 20. № 23. P. 2911-2915.
- 209) Pamp S.J., Gjermansen M., Johansen H.K., Tolker-Nielsen T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 68. № 1. P. 223–240.
- 210) Papa R., Parrilli E., Sannino F., Barbato G., Tutino M.L., Artini M., Selan L. Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 // *Res. Microbiol.* 2013. V. 164. № 5. P. 450–456.

- 211) Passos da Silva D., Matwichuk M.L., Townsend D.O., Reichhardt C., Lamba D., Wozniak D.J., Parsek M.R. The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix // Nat. Commun. 2019. V. 10. Article 2183. Doi: 10.1038/s41467-019-10201-4.
- 212) Pastagia M., Schuch R., Fischetti V.A, Huang D.B. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives // J. Med. Microbiol. 2013. V. 62. № Pt 10. P. 1506–1516.
- 213) Patil P.D., Jin Y., Luk Y.-Y. Chemical control over Asialo-GM1: a dual ligand for pili and lectin A that activates swarming motility and facilitates adherence of *Pseudomonas aeruginosa* // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2022. V. 215. Article 112478. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.112478.
- 214) Pertici F., de Mol N.J., Kemmink J., Pieters R.J. Optimizing divalent inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA by using a rigid spacer // Chemistry. 2013. V. 19. № 50. P. 16923–19927.
- 215) Pertici F., Pieters R.J. Potent divalent inhibitors with rigid glucose click spacers for *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA // Chem. Commun. (Camb). 2012. V. 48. № 33. P. 4008–4010.
- 216) Pestrak M.J., Baker P., Dellos-Nolan S., Hill P.J., Passos da Silva D., Silver H., Lacdao I., Raju D., Parsek M. R., Wozniak D.J., Howell P.L. Treatment with the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG combats wound infection by improving antibiotic efficacy and host innate immune activity // Antimicrob. Agents Chemother. 2019. V. 63. № 6. Article e00234-19. Doi: 10.1128/AAC.00234-19.
- 217) Pires D.P., Melo L.D.R., Vilas Boas D., Sillankorva S., Azeredo J. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections // Curr. Opin. Microbiol. 2017. V. 39. P. 48–56.
- 218) Placencia F.X., Kong L., Weisman L.E. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal mice: lysostaphin versus vancomycin. // Pediatr. Res. 2009. V. 65. № 4. P. 420–424.
- 219) Powell L.C., Pritchard M.F., Ferguson E.L., Powell K.A., Patel S.U., Rye

- P.D., Sakellakou S.-M., Buurma N.J., Brilliant C.D., Copping J.M., Menzies G.E., Lewis P.D., Hill K.E., Thomas D.W. Targeted disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate oligosaccharides // *npj Biofilms Microbiomes*. 2018. V. 4. Article 13. doi:10.1038/s41522-018-0056-3.
- 220) Pradeepa, Shetty A.D., Matthews K., Hegde A.R., Akshatha B., Mathias A.B., Mutalik S., Vidya S.M. Multidrug resistant pathogenic bacterial biofilm inhibition by *Lactobacillus plantarum* exopolysaccharide // *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre*. 2016. V. 8. № 1. P. 7–14.
- 221) Qin Z., Yang L., Qu D., Molin S., Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis* // *Microbiology*. 2009. V. 155. № 7. P. 2148–2156.
- 222) Qu Y., Daley A.J., Istivan T.S., Rouch D.A., Deighton M.A. Densely adherent growth mode, rather than extracellular polymer substance matrix build-up ability, contributes to high resistance of *Staphylococcus epidermidis* biofilms to antibiotics // *J. Antimicrob. Chemother.* 2010. V. 65. № 7. P. 1405–1411.
- 223) Ragland S.A., Criss A.K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13. № 9. Article e1006512. Doi: 10.1371/journal.ppat.1006512.
- 224) Ray V.A., Hill P.J., Stover C.K., Roy S., Sen C.K., Yu L., Wozniak D.J., DiGiandomenico A. Anti-Psl targeting of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms for neutrophil-mediated disruption // *Sci. Rep.* 2017. V. 7(1). Article 16065. Doi: 10.1038/s41598-017-16215-6.
- 225) Redman W.K., Welch G.S., Williams A.C., Damron A.J., Northcut W.O., Rumbaugh K.P. Efficacy and safety of biofilm dispersal by glycoside hydrolases in wounds // *Biofilm*. 2021. V. 3. Article 100061. Doi: 10.1016/j.bioflm.2021.100061.
- 226) Redman W.K., Welch G.S., Rumbaugh K.P. Differential efficacy of glycoside hydrolases to disperse biofilms // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020. V. 10. Article 379. Doi: 10.3389/fcimb.2020.00379.

- 227) Reffuveille F., De La Fuente-Núñez C., Mansour S., Hancock R.E.W. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. V. 58. № 9. P. 5363-5371.
- 228) Reichhardt C., Jacobs H.M., Matwichuk M., Wong C., Wozniak D.J., Parsek M.R. The versatile *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix protein CdrA promotes aggregation through different extracellular exopolysaccharide interactions // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. № 19. Article e00216-20. Doi: 10.1128/JB.00216-20.
- 229) Rendueles O., Travier L., Latour-Lambert P. Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharide // *MBio.* 2011. V. 2. № 3. Article e00043-11. Doi: 10.1128/mBio.00043-11.
- 230) Reynolds M., Marradi M., Imberty A., Penadés S., Pérez S. Multivalent gold glycoclusters: high affinity molecular recognition by bacterial lectin PA-IL // *Chemistry.* 2012. V. 18. № 14. P. 4264–4273.
- 231) Roberts A.E.L., Kragh K.N., Bjarnsholt T., Diggle S.P. The limitations of in vitro experimentation in understanding biofilms and chronic infection // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. № 23. P. 3646–3661.
- 232) Rodrigue J., Ganne G., Blanchard B., Saucier C., Giguère D., Shiao T.C., Varrot A., Imberty A., Roy R. Aromatic thioglycoside inhibitors against the virulence factor LecA from *Pseudomonas aeruginosa* // *Org. Biomol. Chem.* 2013. V. 11. № 40. P. 6906–6918.
- 233) Roy P.H., Tetu S.G., Larouche A., Elbourne L., Tremblay S., Ren Q., Dodson R., Harkins D., Shay R., Watkins K., Mahamoud Y., Paulsen I.T. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7 // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 1. Article e8842. Doi: 10.1371/journal.pone.0008842.
- 234) Sabala I., Jagielska E., Bardelang P.T., Czapinska H., Dahms S.O., Sharpe J.A., James R., Than M.E., Thomas N.R., Bochtler M. Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans* // *FEBS J.* 2014. V. 281. № 18. P. 4112–4122.
- 235) Sacco L.P., Castellane T.C.L., Polachini T.C., de Macedo Lemos E.G., Alves

- L.M.C. Exopolysaccharides produced by *Pandoraea* shows emulsifying and anti-biofilm activities // J. Polym. Res. 2019. V. 26. Article 91. Doi: 10.1007/s10965-019-1737-1.
- 236) Dos Santos Goncalves M., Delattre C., Balestrino D., Charbonnel N., Elboutachfaiti R., Wadouachi A., Badel S., Bernardi T., Michaud P., Forestier C. Anti-biofilm activity: a function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. Article e99995. Doi: 10.1371/journal.pone.0099995.
- 237) São-José C. Engineering of phage-derived lytic enzymes: improving their potential as antimicrobials // Antibiotics. 2018. V. 7. Article 29. Doi: 10.3390/antibiotics7020029.
- 238) Sardar R.K., Kavita K., Jha B. Lipopolysaccharide of *Marinobacter litoralis* inhibits swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 // Carbohydr. Polym. 2015. V. 123. P. 468–475.
- 239) Sato A., Yamaguchi T., Hamada M., Ono D., Sonoda S., Oshiro T., Nagashima M., Kato K., Okazumi S., Katoh R., Ishii Y., Tateda K. Morphological and biological characteristics of *Staphylococcus aureus* biofilm formed in the presence of plasma // Microb. Drug Resist. 2019. V. 25. № 5. P. 668–676.
- 240) Sayem S.A., Manzo E., Ciavatta L., Tramice A., Cordone A., Zanfardino A., De Felice M., Varcamonti M. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis* // Microb. Cell Fact. 2011. V. 10. Article 74. <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/74>.
- 241) Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
- 242) Schuster M., Lostroh C.P., Ogi T., Greenberg E.P. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 7. P. 2066–2079.
- 243) Sepandj F., Ceri H., Gibb A., Read R., Olson M. Minimum inhibitory

- concentration versus minimum biofilm eliminating concentration in evaluation of antibiotic sensitivity of enterococci causing peritonitis // *Perit. Dial. Int.* 2007. V. 27. P. 464–465.
- 244) Shah A., Mond J., Walsh S. Lysostaphin-coated catheters eradicate *Staphylococcus aureus* challenge and block surface colonization // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. V. 48. № 7. P. 2704–2707.
- 245) Shahrour H., Ferrer-Espada R., Dandache I., Bárcena-Varela S., Sánchez-Gómez S., Chokr A., Martínez-de-Tejada G. AMPs as anti-biofilm agents for human therapy and prophylaxis // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019. V. 1117. P. 257–279.
- 246) Shanina E., Kuhaudomlarp S., Siebs E., Fuchsberger F.F., Denis M., da Silva Figueiredo Celestino Gomes P., Clausen M.H., Seeberger P.H., Rognan D., Titz A., Imberty A., Rademacher C. Targeting undruggable carbohydrate recognition sites through focused fragment library design // *Commun. Chem.* 2022. V. 5. Article 64. Doi: 10.1038/s42004-022-00679-3.
- 247) Sharma U., Vipra A., Channabasappa S. Phage-derived lysins as potential agents for eradicating biofilms and persisters // *Drug Discov. Today.* 2018. V. 23. № 4. P. 848–856.
- 248) Shen Y., Köller T., Kreikemeyer B., Nelson D.C. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. V. 68. № 8. P. 1818–1824.
- 249) Siebs E., Shanina E., Kuhaudomlarp S., Gomes P. da S.F.C., Fortin C., Seeberger P.H., Rognan D., Rademacher C., Imberty A., Titz A. Targeting the central pocket of the *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA // *ChemBioChem.* 2021. V. 23. № 3. Article e202100563. Doi: 10.1002/cbic.202100563.
- 250) Simmonds R.S., Naidoo J., Jones C.L., Tagg J.R. The streptococcal bacteriocin-like inhibitory substance, zoocin a, reduces the proportion of *Streptococcus mutans* in an artificial plaque // *Microb. Ecol. Health Dis.* 1995. V. 8. № 6. P. 281–292.
- 251) Smadhi M., de Bentzmann S., Imberty A., Gingras M., Abderrahim R.,

- Goekjian P.G. Expeditive synthesis of trithiotriazine-cored glycoclusters and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation // Beilstein J. Org. Chem. 2014. V. 10. P. 1981–1990.
- 252) Smith K., Hunter I.S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates // J. Med. Microbiol. 2008. V. 57. № 8. P. 966–973.
- 253) Song Y., Sun M., Feng L., Liang X., Song X., Mu G., Tuo Y., Jiang S., Qian F. Antibiofilm activity of *Lactobacillus plantarum* 12 exopolysaccharides against *Shigella flexneri* // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. № 15. Article e00694-20. Doi: 10.1128/AEM.00694-20.
- 254) Soomro Z.H., Cecioni S., Blanchard H., Praly J.-P., Imberty A., Vidal S., Matthews S.E. CuAAC synthesis of resorcin[4]arene-based glycoclusters as multivalent ligands of lectins // Org. Biomol. Chem. 2011. V. 9. № 19. P. 6587–6597.
- 255) Sousa A.M., Pereira M.O. *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs-a review // Pathog. (Basel, Switzerland). 2014. V. 3. № 3. P. 680–703.
- 256) Spanò A., Laganà P., Visalli G., Maugeri T.L., Gugliandolo C. In vitro antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic *Bacillus licheniformis* T14 // Curr. Microbiol. 2016. V. 72. № 5. P. 518–528.
- 257) Stewart P.S., Franklin M.J. Physiological heterogeneity in biofilms // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6. № 3. P. 199–210.
- 258) Sugimoto S., Sato F., Miyakawa R., Chiba A., Onodera S., Hori S., Mizunoe Y. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus* // Sci. Rep. 2018. V. 8. Article 2254. Doi:10.1038/s41598-018-20485-z.
- 259) Sumrall E.T., Hofstee M.I., Arens D., Röhrig C., Baertl S., Gehweiler D., Schmelcher M., Loessner M.J., Zeiter S., Richards R.G., Moriarty T.F. An enzymatic regimen for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* orthopaedic

- device-related infection // *Antibiotics*. 2021. V. 10. № 10. Article 1186. Doi: 10.3390/antibiotics10101186.
- 260) Tang J.N., Kang M.S., Chen H.C., Shi X.M., Zhou R., Chen J., Du Y.W. The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria // *Sci. China Life Sci.* 2011. V. 54. № 9. P. 863–869.
- 261) Thorn C.R., Howell P.L., Wozniak D.J., Prestidge C.A., Thomas N. Enhancing the therapeutic use of biofilm-dispersing enzymes with smart drug delivery systems // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021. V. 179. Article 113916. Doi: 10.1016/j.addr.2021.113916.
- 262) Tolker-Nielsen T. *Biofilm Development* // *Microbiol. Spectr.* 2015. V. 3. № 2. Article MB-0001-2014. Doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014.
- 263) Tossavainen H., Raulinaitis V., Kauppinen L., Pentikäinen U., Maaheimo H., Permi P. Structural and functional insights into lysostaphin–substrate interaction // *Front. Mol. Biosci.* 2018. V. 5. Article 60. Doi: 10.3389/fmolb.2018.00060.
- 264) Travier L., Rendueles O., Ferrières L., Herry J.M., Ghigo J.M. *Escherichia coli* resistance to nonbiocidal antibiofilm polysaccharides is rare and mediated by multiple mutations leading to surface physicochemical modifications // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 8. P. 3960–3968.
- 265) Trizna E., Bogachev M.I., Kayumov A. Degrading of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by extracellular levanase SacC from *Bacillus subtilis* // *Bionanoscience*. 2018. V. 9. № 1. P. 48-52.
- 266) Urbaniec J., Xu Y., Hu Y., Hingley-Wilson S., McFadden J. Phenotypic heterogeneity in persisters: a novel ‘hunker’ theory of persistence // *FEMS Microbiol. Rev.* 2021. V. 46. № 1. Article fuab042. Doi: 10.1093/femsre/fuab042.
- 267) Urish K.L., Cassat J.E. *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: bone, bugs, and surgery // *Infect. Immun.* 2020. V. 88. № 7. Article e00932-19. Doi: 10.1128/IAI.00932-19.
- 268) Valle J., Da Re S., Henry N., Fontaine T., Balestrino D., Latour-Lambert P., Ghigo J.-M. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide

- // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. V. 103. № 33. P. 12558–12563.
- 269) Vasconcelos M.A., Arruda F.V.S., Carneiro V.A., Silva H.C., Nascimento K.S., Sampaio A.H., Cavada B., Teixeira E.H., Henriques M., Pereira M.O. Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts // Biomed Res. Int. 2014. V. 2014. Article 365272. Doi: 10.1155/2014/365272.
- 270) Vazquez-Rodriguez A., Vasto-Anzaldo X.G., Barboza Perez D., Vázquez-Garza E., Chapoy-Villanueva H., García-Rivas G., Garza-Cervantes J.A., Gómez-Lugo J.J., Gomez-Loredo A.E., Garza Gonzalez M.T., Zarate X., Morones-Ramirez J.R. Microbial competition of *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L and *E. coli* increase biosynthesis of non-toxic exopolysaccharide with applications as a wide-spectrum antimicrobial // Sci. Rep. 2018. V. 8. Article 798. Doi:10.1038/s41598-017-17908-8.
- 271) Villringer S., Madl J., Sych T., Manner C., Imberty A., Römer W. Lectin-mediated protocell crosslinking to mimic cell-cell junctions and adhesion // Sci. Rep. 2018. V. 8. Article 1932. Doi:10.1038/s41598-018-20230-6.
- 272) Visini R., Jin X., Bergmann M., Michaud G., Pertici F., Fu O., Pukin A., Branson T.R., Thies-Weesie D.M.E., Kemmink J., Gillon E., Imberty A., Stocker A., Darbre T., Pieters R.J., Reymond J.-L. Structural insight into multivalent galactoside binding to *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA // ACS Chem. Biol. 2015. V. 10. № 11. P. 2455-2462.
- 273) 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 // Angew. Chemie. 2017. V. 129. № 52. P. 16768-16791.
- 274) Wagner V.E., Bushnell D., Passador L., Brooks A.I., Iglewski B.H. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 7. P. 2080–2095.
- 275) Walencka E., Sadowska B., Rózalska S., Hryniewicz W., Rózalska B. Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication // Polish J. Microbiol. 2005. V. 54. № 3. P. 191–200.

- 276) Walencka E., Sadowska B., Rózalska S., Hryniewicz W., Rózalska B. *Staphylococcus aureus* biofilm as a target for single\ nor repeated doses of oxacillin, vancomycin, linezolid and/or lysostaphin // *Folia Microbiol.* 2006. V. 51. № 5. P. 381–386.
- 277) Wang S., Dupin L., Noël M., Carroux C.J., Renaud L., Géhin T., Meyer A., Souteyrand E., Vasseur J.-J., Vergoten G., Chevotot Y., Morvan F., Vidal S. Toward the rational design of galactosylated glycoclusters that target *Pseudomonas aeruginosa* lectin A (LecA): influence of linker arms that lead to low-nanomolar multivalent ligands // *Chem. - A Eur. J.* 2016. V. 22. № 33. P. 11785-11794.
- 278) Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation // *Science.* 2002. V. 295. № 5559. P. 1487–1487.
- 279) Whiteley M., Lee K.M., Greenberg E.P. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. V. 96. № 24. P. 13904–13909.
- 280) Wille J., Coenye T. Biofilm dispersion: the key to biofilm eradication or opening Pandora's box? // *Biofilm.* 2020. V. 2. Article 100027. Doi: 10.1016/j.bioflm.2020.100027.
- 281) Williams P., Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules // *Curr. Opin. Microbiol.* 2009. V. 12. № 2. P. 182–191.
- 282) Windolf C.D. Lögters T., Scholz M., Windolf J., Flohé S. Lysostaphin-coated titan-implants preventing localized osteitis by staphylococcus aureus in a mouse model // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 12. Article e115940. Doi: 10.1371/journal.pone.0115940.
- 283) Winzer K., Falconer C., Garber N.C., Diggle S.P., Camara M., Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 22. P. 6401–6411.
- 284) Wittekind M., Schuch R. Cell wall hydrolases and antibiotics: Exploiting

- synergy to create efficacious new antimicrobial treatments // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016. V. 33. P. 18–24.
- 285) Wittmann V., Pieters R.J. Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates // *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42. № 10. P. 4492–503.
- 286) Wu H., Moser C., Wang H.-Z., Høiby N., Song Z.-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections // *Int. J. Oral Sci.* 2015. V. 7. P. 1-7.
- 287) Wu J.A., Kusuma C., Mond J.J., Kokai-Kun J.F. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and staphylococcus epidermidis biofilms on artificial surfaces // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. V. 47. № 11. P. 3407–3414.
- 288) Wu L., Holbrook C., Zaborina O., Ploplys E., Rocha F., Pelham D., Chang E., Musch M., Alverdy J. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a lethal virulence determinant, the PA-I lectin/adhesin, in the intestinal tract of a stressed host // *Ann. Surg.* 2003. V. 238. № 5. P. 754–764.
- 289) Wu L., Estrada O., Zaborina O., Bains M., Shen L., Kohler J.E., Patel N., Musch M. W., Chang E. B., Fu Y.-X., Jacobs M. A., Nishimura M.I., Hancock R.E.W., Turner J.R., Alverdy J.C. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa* // *Science.* 2005. V. 309. № 5735. P. 774–777.
- 290) Wu S., Liu G., Jin W., Xiu P., Sun C. Antibiofilm and anti-infection of a marine bacterial exopolysaccharide against *Pseudomonas aeruginosa* // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Article 102. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00102.
- 291) Xu X., Peng Q., Zhang Y., Tian D., Zhang P., Huang Y., Ma L., Qiao Y., Shi B. A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties in vitro // *Food Nutr. Res.* 2020. V. 64. Article 3744. Doi: 10.29219/fnr.v64.3744.
- 292) Yang S., Cheng X., Jin Z., Xia A., Ni L., Zhang R., Jin F. Differential production of Psl in planktonic cells leads to two distinctive attachment phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. № 14. Article e00700-18. Doi: 10.1128/AEM.00700-18.
- 293) Yu G., Thies-Weesie D.M.E., Pieters R.J. Tetravalent *Pseudomonas*

- aeruginosa* adhesion lectin LecA inhibitor for enhanced biofilm inhibition // *Helv. Chim. Acta*. 2019. V. 102. № 3. Article e1900014. Doi: 10.1002/hlca.201900014.
- 294) Yu G., Vicini A.C., Pieters R.J. Assembling of divalent ligands and their effect on divalent binding to *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA // *J. Org. Chem.* 2019. V. 84. № 5. P. 2470-2488.
- 295) Zaborin A., Gerdes S., Holbrook C., Liu D. C., Zaborina O.Y., Alverdy J.C. *Pseudomonas aeruginosa* overrides the virulence inducing effect of opioids when it senses an abundance of phosphate // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 4. Article e34883. Doi: 10.1371/journal.pone.0034883.
- 296) Zaborina O., Lepine F., Xiao G., Valuckaite V., Chen Y., Li T., Ciancio M., Zaborin A., Petroff E., Turner J.R., Rahme L. G., Chang E., Alverdy J.C. Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa* // *PLoS Pathog.* 2007. V. 3. № 3. Article e35. Doi: 10.1371/journal.ppat.0030035.
- 297) Zahorska E., Kuhadomlarp S., Minervini S., Yousaf S., Lepsik M., Kinsinger T., Hirsch A., Imberty A., Titz A. A rapid synthesis of low-nanomolar divalent LecA inhibitors in four linear steps from d-galactose pentaacetate // *Chem. Commun.* 2020. V. 56. № 62. P. 8822–8825.
- 298) Zapotoczna M., McCarthy H., Rudkin J.K., O’Gara J.P., O’Neill E. An essential role for coagulase in staphylococcus aureus biofilm development reveals new therapeutic possibilities for device-related infections // *J. Infect. Dis.* 2015. V. 212. № 12. P. 1883–1893.
- 299) Zhang C., Shi D.T., Yan K.C., Sedgwick A.C., Chen G.R., He X.P., James T.D., Ye B., Hu X.L., Chen D. A glycoconjugate-based gold nanoparticle approach for the targeted treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Nanoscale*. 2020. V. 12. № 45. P. 23234–23240.
- 300) Zheng S., Eierhoff T., Aigal S., Brandel A., Thuenauer R., de Bentzmann S., Imberty A., Römer W. The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA triggers host cell signalling by glycosphingolipid-dependent phosphorylation of the adaptor protein CrkII // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2017. V. 1864, № 7. P. 1236-1245.

- 301) Zhu L., Poosarla V. G., Song S., Wood T.L., Miller D.S., Yin B., Wood T.K. Glycoside hydrolase DisH from *Desulfovibrio vulgaris* degrades the N-acetylgalactosamine component of diverse biofilms // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. № 6. P. 2026-2037.
- 302) Zuttion F., Ligeour C., Vidal O., Wälte M., Morvan F., Vidal S., Vasseur J., Chevotot Y., Phaner-Goutorbe M., Schillers H. The anti-adhesive effect of glycoclusters on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria adhesion to epithelial cells studied by AFM single cell force spectroscopy // *Nanoscale.* 2018. V. 10. № 26. P. 12771–12778.
- 303) Zuttion F., Sicard D., Dupin L., Vergoten G., Girard-Bock C., Madaoui M., Chevotot Y., Morvan F., Vidal S., Vasseur J.-J., Souteyrand E., Phaner-Goutorbe M. Deciphering multivalent glycocluster-lectin interactions through AFM characterization of the self-assembled nanostructures // *Soft Matter.* 2019. V. 15. № 36. P. 7211-7218.