

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Пермский государственный национальный
исследовательский университет»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Пермский федеральный исследовательский центр Уральского
отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

ЦЫГАНОВ ИВАН ВАДИМОВИЧ

**ЗАВИСИМОСТЬ ТОЛЕРАНТНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ К
АНТИБИОТИКАМ ОТ ФАКТОРОВ РЕГУЛЯЦИИ СКОЛЬЖЕНИЯ И
ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОВ**

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Диссертация
На соискание ученой степени
Кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Ткаченко Александр Георгиевич

Пермь – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Актуальность темы исследования и степень её разработанности	5
Научная новизна полученных результатов	7
Методология и методы исследования	8
Теоретическая и практическая значимость работы	8
Основные положения, выносимые на защиту	8
Степень достоверности и апробация результатов	9
Публикации по теме диссертации	10
Объём и структура диссертации	11
Личное участие автора	12
Благодарности	12
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1 Проблема устойчивости микобактерий к антибиотикам	13
1.1.1 Связь персистенции микобактерий и развития лекарственно устойчивого туберкулёза и микобактериозов	13
1.1.2 Роль алармона ppGpp в формировании персистенции микобактерий	16
1.1.3 Перспективы противодействия микобактериальной персистенции	18
1.2 Микобактериальные биоплёнки и их значение для выживания клеток в неблагоприятных условиях	19
1.2.1 Особенности строения биоплёнок микобактерий	20
1.2.2 Толерантность к антибиотикам бактерий в составе биоплёнок	22
1.2.3 Жизненный цикл микобактериальных биоплёнок	24
1.3 Механизм перемещения микобактерий	26
1.3.1 Механизм скольжения микобактерий	27
1.3.2 Особенности скольжения микобактерий	28
1.3.3 Связь между скольжением и биопленкообразованием микобактерий	28
1.4 Физиологические функции полифосфатов у бактерий	30
1.4.1 Характеристика полифосфатов	30
1.4.2 Участие алармонсинтез в регуляции внутриклеточных концентраций полифосфатов	31
1.4.3 Функции полифосфатов	34

1.4.4 Влияние полифосфатов на физиологические процессы бактерий	34
1.5 Физиологические функции биогенных полиаминов у бактерий	37
1.5.1 Характеристика полиаминов.....	37
1.5.2 Основные функции полиаминов.....	38
1.5.3 Влияние экзогенных полиаминов на патогенность бактерий. ..	42
1.5.4 Влияние экзогенных полиаминов на микобактерии.....	44
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	46
2.1 Объект исследования	46
2.2 Питательные среды и условия культивирования	46
2.3 Метод культивирования поверхностных биоплёнок <i>M. smegmatis</i> .	48
2.4 Метод культивирования скользящих колоний <i>M. smegmatis</i>	48
2.5 Определение чувствительности <i>M. smegmatis</i> к антибиотикам.....	49
2.6 Определение размеров агрегатов клеток у штаммов <i>M. smegmatis</i> .	49
2.7 Флуориметрический метод определения полиаминов с использованием тонкослойной хроматографии	50
2.8 Определение содержания полиаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	51
2.9 Количественная оценка содержания полифосфатов в клетках <i>M. smegmatis</i>	52
2.10 Определение содержания гликопептидолипидов в штаммах <i>M. smegmatis</i>	53
2.11 Определение гидрофобности бактериальной оболочки.....	54
2.12 Исследование клеточной поверхности микобактерий методом атомно-силовой микроскопии	54
2.13 Компьютерная обработка фотоснимков с целью количественной оценки способности <i>M. smegmatis</i> к скольжению в присутствии антибиотиков и полиаминов.....	55
2.14 Статистическая обработка результатов.....	56
Глава 3. Результаты исследований.....	57
3.1 Исследование функций алармонсинтетаз в формировании биоплёнок и скольжении при переходе культуры <i>M. smegmatis</i> в стационарную фазу роста.	57
3.1.1 Влияние активности генов алармонсинтетаз на биопленкообразование микобактерий	57
3.1.2 Влияние активности генов алармонсинтетаз на скольжение микобактерий.....	60

3.1.4 Исследование влияния алармонсинтетаз на характер монослоя скользящих колоний <i>M. smegmatis</i>	63
3.2 Оценка эффективности воздействия ингибитора персистенции DMNP на клетки <i>M. smegmatis</i> в условиях формирования биоплёнок и скольжения в сравнении с традиционными противотуберкулёзными антибиотиками	66
3.2.1 Сравнение эффективности традиционных антибиотиков и ингибитора персистенции клеток <i>M. smegmatis</i> в условиях формирования биоплёнок	66
3.2.2 Сравнение эффективности традиционных антибиотиков и ингибитора персистенции клеток <i>M. smegmatis</i> в условиях скольжения	76
3.3 Изучение роли гликопептидолипидов и полифосфатов в формировании биоплёнок и скольжения микобактериальных клеток..	81
3.3.1 Роль гликопептидолипидов в скольжении и формировании биоплёнок <i>M. smegmatis</i>	81
3.3.2 Роль полифосфатов в скольжении и формировании биоплёнок <i>M. smegmatis</i>	84
3.4 Изучение влияния полиаминов на синтез гликопептидолипидов и полифосфатов в процессе формирования биопленок и скольжения	88
3.4.1 Исследование способности микобактерий синтезировать полиамины	88
3.4.2 Влияние полиаминов на интенсивность синтеза гликопептидолипидов в процессе биопленкообразования	92
3.4.3 Влияние полиаминов на эффективность антибиотиков в отношении биоплёночных сообществ микобактерий	100
3.4.4 Влияние полиаминов на интенсивность синтеза гликопептидолипидов в процессе скольжения	103
3.4.5 Влияние полиаминов на интенсивность синтеза полифосфатов в процессе биоплёнкообразования и скольжения	108
3.4.6 Совместное влияние полиаминов, традиционных антибиотиков, а также ингибитора персистенции DMNP на интенсивность синтеза полифосфатов	111
Глава 4. Обсуждение результатов	120
Заключение	127
Выводы	129
Список сокращений	130
Библиографический список	131

ВВЕДЕНИЕ

В диссертационной работе представлены результаты исследования механизма физиологической толерантности микобактерий к антибиотикам в процессе формирования биоплёнок и скольжения. Проведена сравнительная оценка активности в отношении скользящих колоний и биоплёнок микобактерий стандартных противомикобактериальных антибиотиков и 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановой кислоты, сокращенно DMNP – синтетического аналога эрогоргияена, способного эффективно действовать на персистентные клетки микобактерий. Диссертационное исследование проведено в лаборатории адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов. В ходе работы установлено влияние алармонсинтетаз микобактерий на формирование биоплёнок и скольжение, показана ингибирующая эффективность DMNP в отношении формирования биоплёночных сообществ по сравнению с её отсутствием у традиционных противотуберкулёзных антибиотиков, а также усиление эффекта DMNP в присутствии биогенных полиаминов – спермидина и спермина – распространённых метаболитов, содержащихся в тканях большинства многоклеточных организмов.

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Одной из наиболее серьёзных проблем в области клинической микробиологии в настоящее время является снижение эффективности действия антибиотиков, связанное с распространением антибиотикорезистентных форм бактерий. Но существенный вклад в распространение хронических инфекций вносит также физиологическая толерантность микроорганизмов к антибиотикам, обусловленная персистенцией – явлением, при котором бактерии избегают летального действия антибиотиков за счёт их перехода в физиологическое состояние, характеризующееся невосприимчивостью к антибактериальным препаратам [Stokes *et al.*, 2019]. Развитию неспецифической толерантности способствуют поведенческие реакции бактерий, такие как коллективное

перемещение (скольжение, роение) [Schorey, Sweet, 2008] и биоплёнкообразование [Chakraborty, Kumar, 2019]. Переход к ним может быть реакцией на стрессоры окружающей среды и частично или полностью регулируется молекулами-алармонами и стриндгент факторами микроорганизмов.

Микобактерии – представители семейства микроорганизмов, обладающих наиболее развитыми механизмами формирования физиологической толерантности. Это является серьёзной проблемой для медицины, поскольку одним из представителей микобактерий является возбудитель туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis*. Туберкулез входит в первую десятку причин смертности, согласно данным ВОЗ, а также является главной причиной смерти среди инфекционных заболеваний [WHO, 2024]. Кроме того, в данную группу входят множество нетуберкулёзных патогенных микроорганизмов, вызывающих микобактериозы. Поэтому основным объектом данной диссертационной работы избран быстрорастущий сапрофитный представитель микобактерий *Mycobacterium smegmatis*, который принято использовать в качестве модельного объекта для изучения процессов, свойственных микобактериальным видам, включая *M. tuberculosis* [Chakraborty, Kumar, 2019].

Взаимодействуя с тканями животных или человека, микобактерии встречают множество метаболитов клеток хозяина, в том числе полиамины. Это синтезируемые клетками поликатионы, которые в миллимолярных концентрациях присутствуют в клетках и тканях большинства организмов. Наиболее часто в биологических объектах встречаются четыре вида полиаминов: путресцин, кадаверин, спермидин и спермин. При этом первые два синтезируются преимущественно микроорганизмами, а два других характерны для многоклеточных эукариотических организмов [Pegg, 2016]. Поскольку полиамины обладают сильным положительным зарядом, они способны связываться с отрицательно заряженными молекулами, например, ДНК и РНК, и модулировать множество клеточных функций. Опубликованы данные о способности экзогенных полиаминов оказывать протекторное действие путем снижения чувствительности бактерий к антибиотикам [Tkachenko *et al.*, 2012, Speer *et al.*, 2013, Igarashi,

Kashiwagi, 2018; Hasan *et al.*, 2022]. Поэтому высокие концентрации биогенных поликатионов предполагают возможность существенного влияния на эффективность антибактериальных средств в отношении микобактерий.

Цель исследования: охарактеризовать молекулярный механизм физиологической толерантности микобактерий к антибиотикам в процессе формирования биоплёнок и скольжения.

Задачи исследования:

1. Изучить функции алармонсинтетаз в формировании биоплёнок и скольжении при переходе клеток периодической культуры *M. smegmatis* в стационарную фазу роста.

2. Исследовать функциональную роль гликопептидолипидов и полифосфатов в формировании биоплёнок и скольжении микобактериальных клеток.

3. Оценить регуляторный эффект полиаминов на интенсивность синтеза гликопептидолипидов и полифосфатов в процессе формирования биоплёнок и скольжения.

4. Провести оценку эффективности воздействия традиционных противотуберкулезных антибиотиков на клетки *M. smegmatis* в условиях формирования биоплёнок и скольжения в сравнении с вновь синтезированным ингибитором персистенции DMNP и на основе полученных экспериментальных данных предложить рекомендации для усиления эффективности изученных антибиотиков.

Научная новизна полученных результатов

Впервые исследовано влияние алармонсинтетаз, продуктов генов *rel_{Msm}* и *relZ*, на процессы биоплёнкообразования и скольжения микобактерий. Установлена корреляция между количеством гликопептидолипидов клеточной поверхности микобактерий и их способностью образовывать поверхностные биопленки. Впервые показано, что биогенные полиамины спермидин и спермин способны влиять на эффективность действия антибиотиков в отношении скользящих клеток микобактерий, а также клеток в составе биопленки, путем

модуляции внутриклеточных уровней полифосфатов. Произведена сравнительная оценка эффективности действия вновь синтезированного ингибитора алармонсинтетаз DMNP и традиционных противомикобактериальных антибиотиков на микобактериальные сообщества клеток (биоплёнки и скользящие колонии).

Методология и методы исследования.

Экспериментальное решение задач исследования осуществлено с применением общепринятых биохимических, фотометрических и микробиологических методов, включая средства обработки данных. Для исследования накопления полиаминов в клетках микобактерий, а также гликопептидолипидов в клеточных стенках микобактерий использовали методы тонкослойной хроматографии. Для исследования динамики полифосфатов в клетках микобактерий применяли методы фотометрической фиксации флуоресценции.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов биоплёнокообразования и скольжения микобактерий. Исследование влияния экзогенных полиаминов позволит эффективнее планировать терапию микобактериозов. Оценка активности основных антибиотиков, применяемых при терапии туберкулеза и других микобактериозов в отношении биоплёнок и скользящих колоний дает представление о реальной эффективности препаратов, а поиск новых антибиотиков со специфическими мишенями, направленных на предотвращение выживания dormantных клеток, является перспективным направлением для сокращения времени терапии и развития антибиотикорезистентности.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Алармонсинтетазы микобактерий, продукты генов *rel_{Msm}* и *relZ*, участвуют в процессе формирования биоплёнок.

2. Гликопептидолипиды и полифосфаты обеспечивают поддержание целостности поверхностной биоплёнки и выживаемость включённых в неё клеток микобактерий при воздействии антибиотиков.

3. Полиамины, посредством регуляции уровня гликопептидолипидов и полифосфатов, участвуют в адаптации микобактерий к антибиотикам в процессе формирования биоплёнок и скольжения.

4. Вновь синтезированное соединение DMNP, обладающее ингибиторной активностью в отношении алармонсинтетаз, более эффективно подавляет формирование биоплёнок по сравнению с традиционными противотуберкулезными антибиотиками – рифампицином и стрептомицином – и может повысить их эффективность при комплексном применении.

Степень достоверности и апробация результатов

Описанные в диссертационной работе результаты получены с использованием современных биохимических, фотометрических и микробиологических методов. Представленные в работе результаты экспериментов являются достоверными, что подтверждается их воспроизводимостью, и не противоречат данным литературы и принятым представлениям о физиологии микроорганизмов, достоверность различий показана с помощью методов математической статистики. Большая часть полученных результатов диссертационной работы опубликована в 19 публикациях в журналах, индексируемых Scopus, Web of Science и рекомендованных ВАК РФ и доложена на всероссийских научных конференциях.

Материалы диссертационной работы представлены на 9 всероссийских конференциях с международным участием: IV Всероссийская научная конференция с международным участием (Иркутск, 3–7 июля 2023 г.), Всероссийская научная конференция с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 28 февраля – 6 марта 2022 г.), 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.), Всероссийской научной конференции с

международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» (Пермь, 18–20 октября 2021 г.), XII Всероссийский конгресс молодых учёных-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2020» (Пермь, 28–30 сентября 2020 г.), XI Всероссийский конгресс молодых учёных-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2019» (Пермь, 13–15 мая 2019 г.), 2-я Международная научная конференция «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (17–19 сентября 2018 г.), IX Всероссийский конгресс молодых учёных-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2016» (Пермь, 4–6 июля 2016 г.), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Наукоёмкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения» (4–6 июля 2016 г.).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 5 – в рецензируемых изданиях Scopus и Web of Science, 4 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Распределение статей по категориям, согласно перечню ВАК, включая приравнивания из других наукометрических баз данных:

Категория	Список публикаций
K1	1. Zamakhaev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. Mycolicibacterium smegmatis possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // The International Journal of Mycobacteriology. 2020. V. 9. № 2. P.138-143. 2. Nesterova L. Yu., Tsyganov I. V., Tkachenko A. G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of <i>Mycobacterium smegmatis</i> // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. V. 56. № 4. P. 387-394. 3. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tsyganov I.V., Vaganov V.Y., Shipilovskikh S.A., Rubtsov

	A.E., Malkov A.V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases // Cell chemical biology. 2021. № 28. P. 1-13. 4. Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics // Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii. 2022. V. 26. № 5. P. 458-466.
К2	1. Нестерова Л. Ю., Цыганов И.В., Ткаченко А. Г. Роль биогенных полиаминов в регуляции скольжения у микобактерий // Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2017. № 3. С. 304-310. 2. Цыганов И.В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Дифференцированная оценка антибиотиков на способность ограничивать скольжение <i>Mycobacterium smegmatis</i> // Вестник Пермского университета. Серия. Биология. 2018. № 4. С. 402-408. 3. Цыганов И.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Скольжение бактерий: способ пассивного распространения без использования жгутиков и пилей (обзор) // Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2021. № 4. С. 263-274. 4. Цыганов И.В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на характер скольжения <i>Mycobacterium smegmatis</i> // Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2024. № 4. С. 401-411.
К3	1. I.V. Tsyganov, A.G. Tkachenko Effect of Exogenous Spermine on Biofilm Formation in Mycobacteria by Stimulating the Synthesis of Glycopeptidolipids // BIO Web of conferences. 2023. T.57. P. 02002.

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Текст изложен на 145 страницах, проиллюстрирован 47 рисунками, включает 11 таблиц, список литературы содержит 213 библиографических источников.

Личное участие автора

Выбор направления диссертационной работы, её цели и задач проводился совместно с научным руководителем – д.м.н., проф., А.Г. Ткаченко. Автором самостоятельно проведён анализ данных литературы по теме диссертации, а также осуществлена основная экспериментальная работа: исследование процессов биоплёнкообразования и скольжения микобактериальных колоний, влияние на эти процессы биогенных полиаминов, антибиотиков и активности алармонсинтетаз, связанные с этим возможные изменения содержания гликопептидолипидов и концентраций полифосфатов у микобактерий. Часть экспериментов по исследованию клеточной поверхности микобактерий выполнена в соавторстве со старшим научным сотрудником лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, к.б.н. Л.Ю. Нестеровой. Синтез DMNP выполнен сотрудниками лаборатории органического синтеза Пермского государственного национального исследовательского университета.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность д.м.н., профессору А.Г. Ткаченко за руководство научной работой, сотрудникам лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ: к.б.н. Л.Ю. Нестеровой за поддержку и помощь на всех этапах работы, к.б.н. Р.Ю. Сидорову за генетическое конструирование штаммов, использованных в работе, а также сотрудникам лаборатории органического синтеза ПГНИУ за плодотворное сотрудничество.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Проблема устойчивости микобактерий к антибиотикам

С проблемой возникновения у бактерий лекарственной устойчивости к антибиотикам исследователи столкнулись практически сразу после открытия самих антибиотиков. В основе явления адаптации бактерий к антибиотическим препаратам лежат два принципиально разных явления: резистентность и персистенция. В первом случае бактерии используют механизмы активного противодействия антибиотикам: модифицируют белок-мишень, активируют помпы выброса в клеточной стенке, изменяют проницаемость бактериальной оболочки и др. Происходит противодействие препарату на уровне отдельных клеток. Во втором случае субпопуляция бактерий внутри большой популяции переходит в состояние персистенции [Bigger, 1944], в котором физиологические процессы замедляются настолько сильно, что антибиотик не сможет нарушить их и убить бактерию.

Наиболее часто явление персистенции встречается при исследовании рецидивов заболеваний. Антибиотики успешно уничтожают активно делящиеся клетки в организме пациента, но малоэффективны в отношении персистеров, которые, после окончания курса антибиотиков, выходят из персистерного состояния и начинают активно размножаться, вызывая рецидив. Более того, действие антибиотика в некоторых случаях может быть сигналом инициации перехода в персистерное состояние [Dörr, Vulić, Lewis, 2010].

1.1.1 Связь персистенции микобактерий и развития лекарственно устойчивого туберкулёза и микобактериозов

Персистенция была открыта в 1944 году, когда исследователь Джозеф Биггер обнаружил, что в популяциях стафилококков есть субпопуляция, которая не погибает от действия антибиотика. После переноса на новую среду, нечувствительные бактерии начинают активно делиться и в возникшей колонии стафилококков большинство бактерий по-прежнему чувствительны к антибиотику, но в ней также существует субпопуляция, нечувствительная к антибиотикам.

Таким образом, толерантность к антибактериальному препарату не являлась генетически обусловленной [Bigger, 1944].

Явление персистенции свойственно всем бактериям, поскольку, во-первых, не требует формирования и закрепления изменений в геноме, и, во-вторых, все бактерии способны контролировать собственные метаболические пути [Stokes *et al.*, 2019]. Это характерно и для патогенных микобактерий.

Микобактерии – это обобщенное название представителей семейства *Mycobacteriaceae* типа Актинобактерий (*Actinobacteria*). Представители семейства микобактерий имеют палочковидную форму 0,2-0,6 мкм в ширину и от 1 до 10 мкм в длину, имеют аэробный тип обмена, а также лишены органелл движения, таких как жгутики или пили, характерных для многих микроорганизмов. Тем не менее, из-за гидрофобной клеточной стенки микобактерии способны перемещаться посредством скольжения по поверхностям сред [Martínez *et al.*, 1999; Recht *et al.*, 2000]. Они не образуют спор [Traag *et al.*, 2010] и плохо окрашиваются по Граму, но, ввиду отсутствия у представителей данного семейства наружной мембраны, считаются грамположительными. Такая особенность также связана с уникальными свойствами клеточной стенки микобактерий, богатой липидами, миколовыми кислотами и поперечными связями у молекул пептидогликана [Alderwick *et al.*, 2015]. Большинство микобактерий являются сапрофитами, и часто встречаются в почве и воде. Неочищенная вода может содержать около 10^9 микобактерий на литр, обычно безвредных [Rook *et al.*, 2007]. В то же время, некоторые представители являются возбудителями болезней – микобактериозов человека и животных. Более того, среди микобактерий существует возбудитель одного из наиболее социально опасных заболеваний человека и животных – туберкулеза – бактерия *Mycobacterium tuberculosis*, а также возбудители других микобактериозов – *M. leprae*, *M. avium*, *M. bovis* и другие.

В настоящее время принята классификация, в которой выделяется один род *Mycobacterium* [Oren A., Garrity G.M., 2019], но некоторое время использовалась другая классификация, в которой единственный род в семействе был разделен на пять новых: *Mycobacteroides*, *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus* и

Mycobacterium [Gupta *et al.*, 2018; Bachmann *et al.*, 2020]. В данной классификации почвенные непатогенные микобактерии, к которым относится *Mycobacterium smegmatis*, выделяли в собственный род *Mycolicibacterium*, из-за чего в литературе в последнее время встречается также видовое название *Mycolicibacterium smegmatis*. Сейчас это родовое имя, согласно базе данных LPSN, является синонимом, но корректно использовать также *Mycobacterium smegmatis* [Oren A., Garrity G.M., 2019]. Для изучения физиологии медленнорастущих микобактерий, как правило являющихся ещё и патогенными, в качестве модельного организма используют штамм *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 [Sparks *et al.*, 2023]. Он непатогенный, но в то же время обладает высокой идентичностью белково-ортологов с патогенными *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. marinum*, *M. avium*, и *M. leprae* [Malhotra S., Vediti S.C., Blundell T.L., 2017; Sparks *et al.*, 2023].

Туберкулез, несмотря на то, что не является неизлечимым заболеванием, входит в первую десятку ведущих причин смертности в мире [WHO, 2024]. Заболеваемость микобактериозами растёт на протяжении последних 30 лет [Adjemian *et al.*, 2012; Morimoto *et al.*, 2014] и в США уже превзошла заболеваемость туберкулёзом [Strollo *et al.*, 2015]. Несмотря на актуальность проблемы, существующие методы лечения нельзя назвать оптимальными. Лечение туберкулеза требует не менее полугодового курса [Ryan *et al.*, 2010], тогда как курс лечения некоторых микобактериозов может достигать 12 месяцев [Haworth *et al.*, 2017]. При этом существует вероятность рецидива заболевания в более тяжелой форме, вызванной штаммами, обладающими лекарственной устойчивостью [Chakraborty, Kumar, 2019]. Трудности терапии связаны как с защитными механизмами бактерий, например, биоплёнкообразованием, которое, как было недавно показано, происходит и в легочных полостях организма хозяина [Ojha *et al.*, 2005], так и с явлением персистенции [Ojha *et al.*, 2005]. Антибиотики, как правило, эффективны против активно делящихся бактерий и неэффективны против персистеров и клеток, находящихся в стационарной фазе роста. Это связано с тем, что бактериальные процессы, являющиеся мишенями антибиотиков, активны в логарифмической фазе роста культуры. В то же время в природе большинство

бактерий пребывают в стационарной стадии роста, и только небольшая часть популяции продолжает активно делиться [Navarro Llorens *et al.*, 2010; Gefen *et al.*, 2014]. Поэтому при лечении микобактериозов и туберкулеза существующие антибиотики быстро уничтожают делящиеся клетки, после чего курс препаратов продолжается в течение месяцев с целью элиминировать покоящиеся клетки.

Кроме того, помимо неуклонно снижающейся эффективности, существующие противомикобактериальные антибиотики обладают множеством побочных эффектов. Так, согласно мета анализу 16 исследований терапии нетуберкулезных инфекций, 6 процентам испытуемых пришлось изменить дозу препаратов или же прекратить лечение из-за побочных эффектов, а каждый восьмой пациент отказался от лечения по той же причине [Kwak *et al.*, 2017]. Это ведёт к росту рецидивов заболеваний, количество которых, в зависимости от штамма, достигает 50% в течение последующих 4 лет [Lam *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2015]. Таким образом, с каждым годом поиск новых препаратов и методов лечения туберкулеза и микобактериозов становится всё более актуальным.

1.1.2 Роль алармона prGpp в формировании персистенции микобактерий

Персистеры – это формы бактериальных клеток, генетически восприимчивые к воздействию антибиотика, но обладающие высокой степенью фенотипической толерантности к их воздействию, благодаря пребыванию в дормантном состоянии, когда биологические процессы в клетках замедляются или останавливаются полностью [Wayne, Sohaskey, 2001]. Переход вегетативной формы бактерий в персистерное состояние может быть как стохастическим [Balabar *et al.*, 2019], так и вызванным воздействием стрессоров внешней среды, например, голоданием [Kumar *et al.*, 2008] или даже действием антибиотиков [Dörr, Vulić, Lewis, 2010]. После снятия бактерицидного воздействия, персистеры способны возобновить рост. Стрессы внутренней среды бактериальных сообществ также могут быть инициаторами персистенции. Например, снижение количества кислорода внутри биоплёнки, а также изменение pH и нехватка питательных веществ могут стимулировать персистенцию [Эль-Регистан *и др.*, 2014]. У активно

размножающейся колонии в экспоненциальной фазе роста количество бактерий-персистеров может составлять около 0,01% [Эль-Регистан *и др.*, 2014; Николаев *и др.*, 2020]. Стохастический переход к персистенции в быстрорастущих колониях, вероятно, также может быть ответом на стресс, возникающий от стохастического изменения содержания ключевых метаболитов в [Ткаченко, 2018]. Наибольшая доля персистентных клеток в популяции микобактерий и других видов формируется в стационарной фазе роста [Brauner *et al.*, 2016]. Это связано в первую очередь с тем, что колония бактерий сталкивается с дефицитом питательных веществ. Аналогичную ситуацию можно наблюдать и в биоплёночных сообществах, когда часть колонии из-за жёсткой пространственной структуры биоплёнки оказывается слишком далеко от питательного субстрата. В результате стресса голодания у микобактерий замедляется метаболизм и процессы, которые являются мишенью для антибиотиков [Lewis, 2010; Эль-Регистан *и др.*, 2014].

На основании фенотипов антибиотикотолерантности можно выделить два основных типа персистеров [Эль-Регистан *и др.*, 2014]:

Персистеры первого типа – это субпопуляция бактерий, пребывающих в стационарной фазе роста. Она невосприимчива к действию антибиотиков и при переносе на среду без антибиотика воспроизводит новую популяцию, которая будет чувствительна к антибиотикам.

Персистеры второго типа – это субпопуляция, существующая внутри активно растущей популяции, но сохраняющая все качества персистеров первого типа.

Ещё одной особенностью персистенции является большое количество генов, которые вовлечены в формирование данного состояния. Это предопределило неудачу исследования процесса через поиск одиночных нокаутов. На данный момент известно, что персистенция микобактерий связана с активностью токсин-антитоксिन-модулей [Gelens *et al.*, 2013] и алармонов (p)ppGpp [Эль-Регистан *и др.*, 2014; Ткаченко, 2018; Замахаяев *и др.*, 2018]. Алармон гуанозин пента-тетрафосфат (p)ppGpp – одна из ключевых молекул-регуляторов стринджен-ответа микобактерий. Алармон накапливается в стационарной фазе роста и под его контролем находится множество внутриклеточных процессов, в том числе

адаптация к стрессам и биоплёнкообразование. Известно, что и алармон, и тонси-антитоксиновые модули участвуют в инициации стринджен-ответа микобактерий. Происходит это благодаря способности алармона гуанозинтетрафосфата, с одной стороны, блокировать расщепление полифосфатов, а, с другой, способствовать расщеплению антитоксиновых модулей [Ткаченко, 2018], что инициирует ответ на стресс и способствует переходу бактерии в состояние персистенции [Sinha *et al.*, 2023].

1.1.3 Перспективы противодействия микобактериальной персистенции

Учитывая такой недостаток классических антибиотиков как низкая эффективность в отношении персистирующих бактерий, новый препарат должен обладать следующим набором характеристик: эффективность действия против клеток в стационарной фазе роста и присутствующих в составе биоплёнок, способность создавать препятствие развитию персистенции, использование в качестве мишени молекул, специфичных для данного вида патогенных бактерий.

Одним из таких перспективных противомикробных препаратов, совмещающих в себе перечисленные качества, является 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановая кислота, или DMNP. Это производное эрогоргиана – природного дитерпена, выделенного из морского коралла *Antillogorgia* (syn. *Pseudopterogorgia*) *elisabethae* и обладающего антибактериальной активностью, особенно в отношении микобактерий [Incerti-Pradillos *et al.*, 2016]. DMNP был синтезирован сотрудниками лаборатории органического синтеза Пермского государственного национального исследовательского факультета, а сотрудниками лаборатории адаптации микроорганизмов было показано, что DMNP подавлял активность алармонсинтетаз микобактерий [Tkachenko *et al.*, 2021]. В данном диссертационном исследовании изучалось влияние DMNP на биоплёнкообразование и скольжение *M. smegmatis*, а также сравнивалась его эффективность с классическими антибиотиками, применяемыми при терапии туберкулёза.

DMNP обладает рядом преимуществ перед привычными антибиотиками. Показано, что одной из его мишеней являются алармонсинтазы Rel, регулирующие уровень алармона (p)ppGpp, что приводит к подавлению персистенции в стационарной фазе роста периодической культуры бактерий [Tkachenko *et al.*, 2021]. Поскольку у млекопитающих отсутствует алармон (p)ppGpp [Mittenhuber, 2001], его синтазы являются подходящей мишенью для антибиотика. Таким образом, DMNP обладает необходимой совокупностью характеристик, позволяющих ему претендовать на роль перспективного антимикобактериального препарата. Тем не менее, для того, чтобы более полно оценить эффективность DMNP, необходимо также исследовать действия данного препарата на уровне формирования биоплёнок и скользящих колоний микобактерий *M. smegmatis*, существенно повышающих толерантность клеток к традиционным антибиотикам, что является одной из задач данной диссертационной работы.

1.2 Микобактериальные биоплёнки и их значение для выживания клеток в неблагоприятных условиях

Биоплёнки – это скопление микроорганизмов, адгезированных на поверхности и агрегированных между собой посредством выделяемых ими в среду специфических полимерных соединений (матрикс). В процессе биоплёнкообразования клетки претерпевают фенотипические изменения, образуя гомогенное, динамичное и дифференцированное сообщество. Это является стратегией бактериального выживания в среде, инициируемой действием различных стрессовых факторов, например, антимикробных агентов или дезинфицирующих средств [Faria *et al.*, 2015].

В лабораторных условиях бактерии, как правило, выращивают в виде «планктонных культур» – суспензий клеток в жидких питательных средах. Такой способ культивирования имеет ряд преимуществ, способствующих поддержанию метаболической и транскриптомной гомогенности исследуемых клеток и обеспечивающих их достаточно высокую скорость роста и размножения, а также

простоту проведения микробиологических манипуляций. Тем не менее, в природе подавляющее большинство бактерий (~95%) существует в составе биоплёнок [Николаев, Плакунов, 2007].

1.2.1 Особенности строения биоплёнок микобактерий

Несмотря на актуальность исследований бактериальных биоплёночных культур, существует ряд фундаментальных проблем, не позволяющих производить исследования микроорганизмов в биоплёнках с той же простотой, что при исследовании планктонных культур. В первую очередь это связано с тем, что подавляющую часть всей сухой массы биоплёнки составляет внеклеточный матрикс (до 90%), продуцируемый клетками [Donlan, 2002; Branda *et al.*, 2005; Rather *et al.*, 2021], целиком обволакивающий бактерии и затрудняющий доступ к ним. Основу матрикса любой биоплёнки составляют экзополисахариды (ЭПС) и липиды, однако, полный состав матрикса отличается у разных видов бактерий и может служить таксономическим признаком [Sutherland, 2001]. Помимо защиты от внешней среды, матрикс формирует каркас, скрепляющий биоплёнку, образует внутренние пустоты и водные каналы [Evans, 2003], обеспечивает межклеточное взаимодействие, и поддерживает круговорот веществ и горизонтальный перенос генов [Chakraborty, Kumar, 2019]. ЭПС матрикса также способствуют адгезии клеток на ранних стадиях цикла развития биоплёночного сообщества [Rather *et al.*, 2021]. Множество видов микобактерий способны к биоплёнкообразованию, среди которых встречаются как условно-патогенные нетуберкулезные бактерии, так и патогенные – *M. tuberculosis* [Ojha *et al.*, 2005; Chakraborty, Kumar, 2019]. Внеклеточный матрикс *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* состоит преимущественно из полисахарида – целлюлозы [Trivedi *et al.*, 2016]. Это подтверждается тем, что штамм *M. smegmatis* со сверхэкспрессией гена целлюлазы MSMEG_6752, которая, как считается, необходима микобактериям для фрагментации биоплёнки и колонизации новых поверхностей, терял способность образовывать поверхностные биоплёнки [Wyk *et al.*, 2017]. Существование целого бактериального сообщества в едином матриксе имеет ряд преимуществ, поскольку клетки в составе биоплёнки,

помимо изменения фенотипа [Flemming *et al.*, 2016], обладают рядом эмерджентных свойств, нехарактерных для отдельных бактерий: повышенная устойчивость к механическим воздействиям [Rather *et al.*, 2021], резистентность к антибиотикам и другим противомикробным препаратам [Niño-Padilla *et al.*, 2021]. Например, минимальная подавляющая концентрация антибиотика (МПК) для бактерий в биоплёнках увеличивается в 100-1000 раз по сравнению с планктонными формами [Ceri *et al.*, 1999]. Такое сильное снижение эффективности традиционных антибиотиков в отношении биоплёнок стимулирует поиск новых соединений, способных подавлять биоплёнкообразование [Kayumov, Nureeva, Trizna *et al.*, 2015; Kayumov, Khakimullina, Sharafutdinov *et al.*, 2015]. Кроме того, биоплёнки являются гетерогенной средой [Chakraborty, Kumar, 2019], которая способствует образованию различных по физиологии субпопуляций, в том числе толерантных, но не резистентных, к антибиотикам – клеток-персисторов [Ojha *et al.*, 2005; Kerns *et al.*, 2014].

Помимо матрикса, продуцируемого бактериями, при биоплёнкообразовании важную роль играет межклеточное взаимодействие. Для беггутиковых микобактерий на этапе адгезии решающими факторами становятся свойства бактериальной оболочки. Её основой у микобактерий, как у всех бактерий, является клеточная стенка из пептидогликана. Микобактериальный пептидогликан, тем не менее, обладает рядом особенностей: наличием N-гликолил и N-ацетилмурамовой кислоты [Mahapatra *et al.*, 2005], остатками глицина или серина [Vollmer *et al.*, 2008], повышенным количеством поперечных связей [Alderwick *et al.*, 2015].

Другим важным компонентом клеточной стенки микобактерий является арабиногалактан. Это высокоразветвленный полисахарид, состоящий из остатков сахаров галактозы и арабинозы [McNeil *et al.*, 1987]. Галактановый компонент представлен цепью из 30 связанных β -D-галактоз и одним концом связан с пептидогликаном, а другим с тремя цепями арабианового компонента – цепей из 30 остатков арабинозы в каждой [Besra *et al.*, 1995]. Арабинан, в свою очередь, является сайтом присоединения третьего основного компонента клеточной стенки – МИКОЛОВЫХ КИСЛОТ.

Миколовые кислоты – это уникальные жирные кислоты, состоящие из длинноцепочечных α -алкил- β -гидрокси жирных кислот. Миколовые кислоты одним концом связаны с арабиногалактаном, а другим с различными липидами внешней оболочки: гликопептидолипидами, мономиколатом глюкозы, димиколатами трегалозы и др. Различают три подкласса миколовых кислот: альфа-миколаты, метоксимиколаты и кетомиколаты [Watanabe *et al.*, 2002]. Миколовые кислоты влияют на проницаемость клеточной стенки микобактерий, предотвращая проникновение липофильных соединений, например, антибиотика норфлоксацина, а также способствуют вирулентности микобактерий [Liu *et al.*, 1996]. Штаммы микобактерий, не способные продуцировать свободные миколовые кислоты, переставали образовывать поверхностные биоплёнки [Sambandan *et al.*, 2013]. Связанные с миколовыми кислотами липиды, гликофосфолипиды, гликопептидолипиды образуют наружную гидрофобную капсулу, иногда называемую псевдовнешней мембраной [Brennan, Nikaido, 1995]. Большое количество гидрофобных липидов образуют барьер, предотвращающий проникновение в клетку гидрофильных соединений, а также способствуют выживаемости, способу перемещения микобактерий – скольжению [Martínez *et al.*, 1999], агрегации клеток и их адгезии к гидрофобным поверхностям, что, в свою очередь, инициирует биоплёнкообразование [Recht *et al.*, 2000].

1.2.2 Толерантность к антибиотикам бактерий в составе биоплёнок

Бактерии, планктонные формы которых не имеют механизмов антибиотикорезистентности, тем не менее проявляют пониженную восприимчивость к антибиотикам, в составе биоплёнки [Эль-Регистан *и др.*, 2014]. Например, бактерии *Klebsiella pneumoniae*, чувствительные к бета-лактамным антибиотикам, имеют минимальную подавляющую концентрацию ампициллина 2 мкг / мл, если находится в водной суспензии. Однако, в составе биоплёнки их жизнеспособность сохраняется после 4 часов воздействия ампициллина в концентрации 5000 мкг / мл. Бактерии, изъятые из биоплёнки, теряют повышенную устойчивость к антибиотику [Stewart, Costerton, 2001]. Первоначально было

выдвинуто несколько гипотез, описывающих механизмы резистентности бактерий к антибиотикам в составе биоплёнок: 1) ограничение проникновения антибиотика внутрь колонии, 2) влияние разности сред внутри и снаружи биоплёнки (изменение количества O_2 или значения pH), 3) образование спор внутри популяции [Stewart, Costerton, 2001]. Однако при дальнейших исследованиях было продемонстрировано, что матрикс не защищает бактерии от всех неблагоприятных факторов и что некоторые антибиотики способны успешно проникать внутрь биоплёнки. Таким образом, возникновение негенетически обусловленной толерантности бактерий связывают с гетерогенной средой внутри биоплёнок [Conlon *et al.*, 2015; Chakraborty, Kumar, 2019] и, как следствие, образованием персистеров, которые способны восстанавливать популяцию после прекращения действия антибиотика [Эль-Регистан *и др.*, 2014].

Инфекции, вызываемые, в том числе нетуберкулезными, микобактериями требуют длительного лечения комбинацией различных антибиотиков. Большинство бактерий погибает в течение двух первых недель, но после этого небольшая резистентная группа сохраняется на протяжении месяцев [Sirgel *et al.*, 2005; Kerns *et al.*, 2014]. Подобную устойчивость микобактерий к лекарственным средствам связывают именно с образованием биоплёнок внутри хозяина [Ryan *et al.*, 2010]. Действительно, согласно гистологическим данным, *M. tuberculosis* образует поверхностные биоплёнки в легочных полостях [Wolinsky, 1979]. Более того, недавнее исследование продемонстрировало реальный случай обнаружения на внутренней полости легкого антибиотикорезистентной биоплёнки *M. abscessus* [Fennelly *et al.*, 2016]. *M. bovis* способен развиваться *in vivo* как во внутриклеточной среде хозяина, так и на поверхности тканей в виде поверхностной биоплёнки. Примечательно, что второй способ для микроорганизма предпочтителен [Nedeltshev *et al.*, 2009].

Толерантность микобактериальных биоплёнок к антибиотикам также связывают в первую очередь с персистенцией. Предполагается, что некоторые бактерии в биоплёнке, расположенные в наибольшем удалении от субстрата испытывают стресс голодания, стимулирующий переход в дормантное состояние.

Авторы данной гипотезы не исключают также, что матрикс в некоторых случаях является эффективным барьером, защищающим от неблагоприятных факторов и антимикробных агентов. Таким образом, персистенция и толстый слой матрикса обеспечивают невосприимчивость микобактерий к антибиотикам.

Ввиду того, что микобактерии, как правило, являются медленно растущими организмами, модельным объектом для изучения физиологии микобактерий, в том числе процессов образования биоплёнок, является быстрорастущий *M. smegmatis*. Данный вид обитает в почвах и не является патогенным, а его скорость деления в 12 раз выше, чем у *M. tuberculosis*. Поскольку это модельный организм, он является наиболее изученным среди микобактерий. Наиболее подробно изучен также процесс его биоплёнкообразования. Ключевую роль в первичной адгезии микобактерий к субстрату и между собой играют компоненты клеточной стенки – гликопептидолипиды (ГПЛ) [Recht *et al.*, 2000]. Важную роль в биоплёнкообразовании играют также миколовые кислоты – другой специфичный компонент их клеточной стенки [Ojha *et al.*, 2005].

1.2.3 Жизненный цикл микобактериальных биоплёнок

Жизненный цикл биоплёнки микобактерий, как и у других видов бактерий, включает следующие этапы: приближение к поверхности и обратимая адгезия, необратимая адгезия, созревание и дисперсия.

Первичная адгезия к абиотическим и биотическим субстратам зависит от физико-химических и электростатических взаимодействий между клеткой и поверхностью, поэтому носят стохастический характер. Отталкивающие и притягивающие силы между бактерией и поверхностью приводят к обратимой адгезии, когда бактерии постоянно присоединяются и вновь покидают поверхность [Donlan, 2002]. Обратимая адгезия зависит от pH среды, температуры, рельефа и заряда субстрата [Шлегель, 1972]. Бактерии легче адгезируются на гидрофобные поверхности, чем на гидрофильные [Donlan, 2002]. Сигналом к инициации процессов биоплёнкообразования микобактерий является также внешний фактор стресса [Gambino, Cappitelli, 2016]. Уровни алармонов микобактерий c-di-GMP и

(p)ppGpp модулируют внутриклеточные процессы, стимулируя биоплёнкообразование при высоких концентрациях. Рост внутриклеточной концентрации алармонов связан с реакциями микобактерий на стресс, причиной которого могут быть неблагоприятные условия среды, нехватка питательных веществ, действие антибиотиков [Gupta *et al.*, 2016].

У других видов бактерий, обладающих органеллами, за первичное закрепление на твёрдой поверхности ответственны также кёрли-волокна, пили, фимбрии и жгутики. Пили – это белковые нити диаметром 5-7 нм и длиной 0,2-2 мкм, расположенные по всей поверхности клетки. Кёрли-волокна – это агрегаты тонких нитей, расположенные на поверхности бактериальной клетки длиной 0,5-1 мкм, диаметром 6-12 нм. В отличие от пилей, кёрли-волокна состоят из белка керлина, а их сборка, происходит внеклеточно [Hammar *et al.*, 1996; Corona-Izquierdo, 2002]. Микобактерии не могут синтезировать ни пили, ни кёрли волокна, ни жгутики, что усложняет им процесс прикрепления к твёрдым субстратам. С другой стороны, их гидрофобная стенка, в которой присутствует множество липидных остатков, по-видимому, способствует тому, что микобактерии образуют биоплёнки преимущественно на поверхности жидких сред, а не на границе водной и твёрдой фаз (Рисунок 1). Такие биоплёнки называю «пелликулами» [Friedman, Kolter, 2004] или «плавающими» биоплёнками [Branda *et al.*, 2005]. Поскольку на поверхности жидкой среды невозможны этапы первичной адгезии к твердой поверхности, адгезия происходит между самими бактериями [Branda *et al.*, 2005].

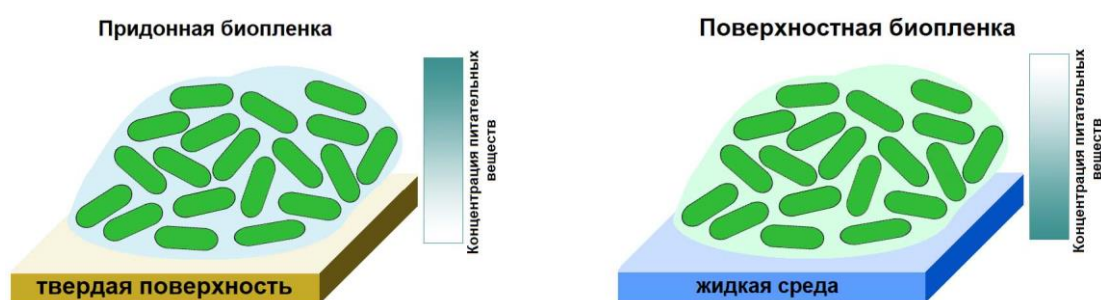


Рисунок 1. Особенности пространственной ориентации придонных и поверхностных биоплёнок.

Поэтому важными условиями образования поверхностных биоплёнок является отсутствие тока воды, повышенная гидрофобность клеточных стенок и межклеточного матрикса [Chakraborty, Kumar, 2019]. При исследовании пелликул микобактерий было установлено, что миколовые кислоты играют важную роль в развитии данных структур [Ojha *et al.*, 2005].

После адгезии основной прирост массы биоплёнок происходит за счёт синтеза межклеточного матрикса, который является главным компонентом, обеспечивающим устойчивое существование зрелой биоплёнки. Биоплёнки продолжают увеличиваться в размерах также и за счёт пролиферации и наслаиванию новых бактерий извне. Пелликулы, как и придонные биоплёнки, состоят в основном из матрикса, продуцируемого бактериями, и также обладают нехарактерной для планктонных форм повышенной устойчивостью к различным стрессорам. Процесс продолжается до тех пор, пока отдельные фрагменты биоплёнки не начинают сепарироваться.

Отделение фрагментов от биоплёнки может протекать как стохастически, в результате действия факторов внешней среды, так и детерминировано, в результате внутриклеточных регуляторных процессов. Так же, как ранее бактерии для образования биоплёнки продуцировали матрикс, локальная экспрессия целлюлаз и протеаз приводит к дроблению биоплёнок и последующему распространению для колонизации новых поверхностей.

1.3 Механизм перемещения микобактерий

Скольжение – процесс поверхностного пассивного движения, свойственный микобактериям, который осуществляется без участия жгутиков или пилей [Murray, Kazmierczak, 2008]. Тем не менее, скольжение доступно не всем бактериям, поскольку для того, чтобы скользить, необходимо снизить трение о поверхность, что обеспечивается либо секрецией специальных веществ, либо свойствами клеточной стенки.

1.3.1 Механизм скольжения микобактерий

Всего описаны три типа скольжения [Hölscher *et al.*, 2017]. К первому типу относят скольжение, возникающее из-за секреции бактериями сурфактанта. Второй тип скольжения требует секреции сразу двух компонентов для снижения трения. Например, сурфактант и полисахарид. Третий тип скольжения происходит без секреции дополнительных веществ, но требует особых свойств клеточной стенки [Hölscher *et al.*, 2017].

Первым из указанных типов скольжения обладают такие виды как *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Serratia marcescens* и *Legionella pneumophila* и многие другие [Stewart *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2011]. Псевдомонады имеют как жгутики, так и пили, но мутанты с делециями генов *fliC* и *pilA* способны только к скольжению [Murray, Kazmierczak, 2008] благодаря секреции рамнолипидов [Kuchma *et al.*, 2007], синингафактина [Nogales *et al.*, 2015] или цикло-ди-ГМФ [Merritt *et al.*, 2007]. Скольжение *Serratia marcescens* осуществляется благодаря секреции серраветина [Matsuyama, *et al.*, 1992; Matsuyama *et al.*, 1995].

Скольжение бактерий, относящихся ко второму типу, возможно за счёт одновременной секреции поверхностно активных веществ и экзополисахаридов. Представителями этой группы являются *Bacillus subtilis* [Kinsinger *et al.*, 2003; Fall *et al.*, 2006] и *Sinorhizobium meliloti* [Gage, Margolin, 2000; Nogales *et al.*, 2012; Seminara *et al.*, 2012; Vlamakis *et al.*, 2013]. *B. subtilis* скользил благодаря секреции сурфактанта флагеллюмина [Kinsinger, Shirk, Fall, 2003] и полисахаридов [Grau *et al.*, 2015]. Для скольжения *S. meliloti* необходим галактоглюкан и ризобактин [Gage, Margolin, 2000; Nogales *et al.*, 2012; Seminara *et al.*, 2012]. С *S. meliloti* также связано важное открытие – была демонстрация скольжения в естественной среде обитания [Gage, Margolin, 2000].

Третий тип скольжения не зависит от наличия поверхностно активных веществ, но осуществляется под давлением, создаваемым в процессе деления клеток. С помощью этого вида скольжения перемещаются *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* [Park *et al.*, 2015] и микобактерии, в частности *Mycobacterium*

smegmatis [Martínez *et al.*, 1999; Recht *et al.*, 2000]. Про скольжение *S. enterica* известно только то, что для перемещения клеткам необходимо наличие поверхностного белка PagM, содержание которого регулируется системой PhoP/PhoQ, индуцируемой низким уровнем ионов магния.

1.3.2 Особенности скольжения микобактерий

Микобактерии долгое время считались неподвижными из-за отсутствия жгутиков, но вскоре было обнаружено, что клетки начинают распространяться по поверхности полужидких сред после продолжительной инкубации [Martínez *et al.*, 1999]. При этом они формировали монослой, в котором бактерии были расположены произвольно. Кроме того, распространение колонии было возможным только во время деления клеток, что позволило определить этот процесс как скольжение.

Также было установлено, что для скольжения микобактериям необходимы гликопептидолипиды [Martínez *et al.*, 1999]. Данные молекулы состоят из смеси длинноцепочечных (C26-C34) жирных кислот, амидированных трипептидом (D-Phe-D-alloThr-D-Ala) с L-аланиолом на конце [Schorey, Sweet, 2008], и расположены на внешней стороне клеточной стенки микобактерий, контактируя с поверхностью. Тем не менее, судя по последним данным, за способность к скольжению микобактерий ответственны не только гликопептидолипиды. Так, мутантный штамм *M. abscessus* *mab_3083c::Tn* скользил быстрее штамма дикого типа, но не отличался по уровню содержания гликопептидолипидов [Liu *et al.*, 2021]. Эти данные дают основание считать процесс скольжения малоизученным, что свидетельствует о необходимости продолжения исследований в этом направлении.

1.3.3 Связь между скольжением и биоплёнкообразованием микобактерий

Как правило, процессы биоплёнкообразования и движения у бактерий антагонистичны [Verstraeten *et al.*, 2008]. Тем не менее, наличие ГПЛ в клеточной стенке микобактерий необходимо как для скольжения, так и биоплёнкообразования [Hölscher *et al.*, 2017]. Мутанты *M. smegmatis* с дефектами в *mps* и синтеза ГПЛ

мембранных белков, кодируемых *gap*, теряли подвижность, в отличие от их родительских форм, способных синтезировать гликопептидолипиды [Agustí *et al.*, 2008]. Некоторые из этих мутантов хуже образовывали биоплёнки на поливинилхлоридных пластинах. Сходные результаты наблюдались и у *pstA/pstB* мутантов *M. avium*. В 2000 году Рехтом [Recht *et al.*, 2000] была предложена модель скользящего типа движения, согласно которой ГПЛ с выступающими жирно-ацильными хвостами, расположенными на поверхности клеточной стенки, создают гидрофобную поверхность, которая снижает трение между бактерией и гидрофильной поверхностью. Мутанты с дефектом ГПЛ имеют гидрофильную поверхность, что приводит к снижению подвижности [Martínez *et al.*, 1999; Recht *et al.*, 2000]. В ходе генетического анализа скольжения и биоплёнкообразования микобактерий было показано, что у мутантов *M. smegmatis* с делециями *mps* и *tntpC* гидрофильная часть гликопептидолипида была обращена наружу. Это приводило к возрастанию трения бактериальной клетки о гидрофильную поверхность агара, а также снижению способности прикрепления к гидрофобной поверхности поливинилхлоридной пластинки и, следовательно, образования биоплёнки [Recht *et al.*, 2000].

Процессы скольжения и биоплёнкообразования микобактерий связаны с работой сигнальных нуклеотидов (вторичных мессенджеров), таких как гуанозин пента-тертафосфат (p)ppGpp и циклический дигуанозинмонофосфат c-di-GMP. У микобактерий (p)ppGpp и c-di-GMP синтезируются и расщепляются бифункциональными белками Rel_{Msm} и DcpA соответственно. Алармон (p)ppGpp как продукт Rel_{Msm} также необходим для длительного выживания *M. smegmatis* во время голодания [Mathew *et al.*, 2004]. В отличие от этого, c-di-GMP контролирует экспрессию генов транспорта и метаболизма липидов через фактор транскрипции LtmA [Li, He, 2012], контролирующего патогенность и состояние покоя у *M. tuberculosis* [Hong *et al.*, 2013]. В то же время штаммы *M. smegmatis* с делецией генов *rel* и *dcpA* демонстрируют измененные свойства клеточной поверхности из-за низкого содержания ГПЛ и полярных липидов в клеточных стенках [Gupta *et al.*, 2016]. Следовательно, можно предполагать, что вторичные мессенджеры (p)ppGpp

и c-di-GMP у *M. smegmatis* принимают участие в регуляции процессов скольжения и биоплёнкообразования.

Поскольку скольжение микобактерий, особенно патогенных видов, является малоизученным процессом, нет исследований о прямой связи скольжения и вирулентности микобактерий. Тем не менее, основываясь на данных о регуляции скольжения алармоном (p)ppGpp, который также связан с персистенцией, можно сделать предположение о том, что в скользящих колониях тоже может происходить образование субпопуляций, толерантных к антибиотикам. Например, в центре скользящей колонии, где может возникать дефицит питательных веществ из-за повышенной плотности бактерий и более низкой скорости распространения.

1.4 Физиологические функции полифосфатов у бактерий

1.4.1 Характеристика полифосфатов

Полифосфаты (PolyP) – линейные полимерные молекулы, состоящие из десятков или сотен остатков ортофосфатов, соединенных макроэргическими фосфоангидридными связями [Kornberg *et al.*, 1999]. Полифосфаты, впервые открытые и описанные как гранулы внутри ацидокальцисом – вакуолей в клетках водорослей и трипаносом [Meurer, 1994] – позднее были обнаружены в клетках других организмов. Длинноцепочечные молекулы полифосфатов, синтезируемые бактериальными клетками, могут достигать в длину 1000 субъединиц [Bowlin, Gray, 2021]. В эукариотических клетках количество ортофосфатов в цепи, как правило, существенно меньше. Например, в тромбоцитах человека длина цепи полифосфатов достигает 80 фосфатных остатков [Kulakovskaya *et al.*, 2016]. Из-за большого числа отрицательно заряженных субъединиц, данный полимер обладает самой высокой плотностью отрицательного заряда, что повышает его реакционную способность. Например, полифосфаты усиливают флуоресценцию 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI). Ортофосфаты включены практически во все процессы жизнедеятельности организмов как компоненты функциональных молекул нуклеиновых кислот, фосфолипидов, фосфопротеинов, метаболитов катаболических и анаболических путей.

Фосфаты, накапливающиеся в почве, поглощаются некоторыми микроорганизмами, растениями и водорослями, и, таким образом, включаются пищевые цепочки. Большинство организмов способно полимеризовать ортофосфаты в полифосфаты. Этим объясняется широкое распространение данных молекул во всех царствах живой природы [Kornberg *et al.*, 1999, Rao *et al.*, 2009].

На основе химической разветвленности полифосфаты делят на три класса: циклические полифосфаты, которые также называют метафосфатами, линейные полифосфаты, и разветвленные полифосфаты (Рисунок 2).

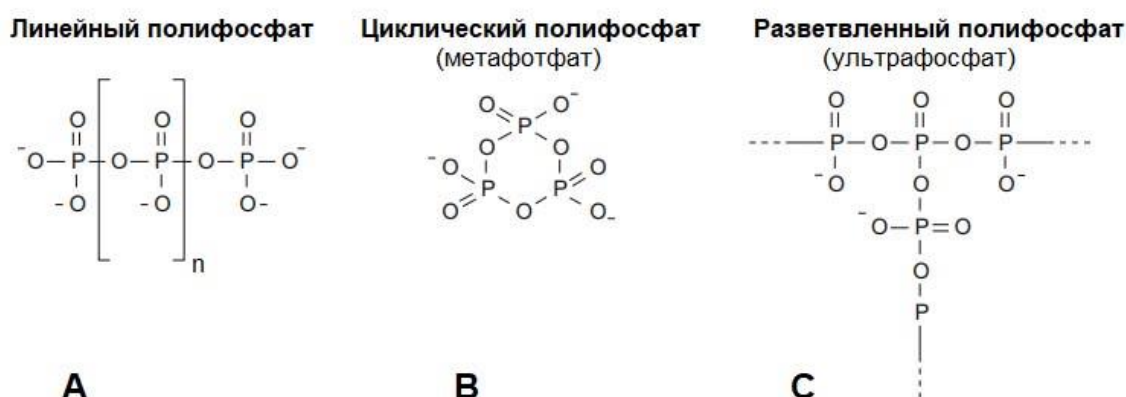


Рисунок 2. Схематическое изображение трёх основных типов структур полифосфатов.

А – линейные полифосфаты, В – циклические полифосфаты (метафосфаты), С – разветвленные полифосфаты (ультрафосфаты).

1.4.2 Участие алармонсинтетаз в регуляции внутриклеточных концентраций полифосфатов

Ферменты ответственные за синтез полифосфатов у высших эукариот на данный момент полностью не идентифицированы [Baijal, Downey, 2021]. У грибов и водорослей полифосфаты синтезируются с помощью фермента VTC4 [Aksoy *et al.*, 2014, Gomes-Vieira *et al.*, 2018]. Гораздо подробнее пути синтеза полифосфатов изучены у микроорганизмов, в том числе у патогенных бактерий, дрожжей и некоторых протист [Albi, Serrano, 2016]. За синтез полифосфатов у бактерий в большинстве случаев ответственны два фермента – полифосфаткиназа 1 (РРК 1 – polyphosphate kinase) и полифосфаткиназа 2 (РРК 2). РРК 1 синтезирует полифосфаты из АТФ, а РРК 2 может использовать для синтеза полифосфатов как АТФ, так и ГТФ. Обе киназы осуществляют синтез за счет реверсивного

транспорта фосфата от трифосфатов к молекуле полифосфата. Полифосфаткиназа 2 способна также гидролизовать полифосфаты для синтеза нуклеотидтрифосфатов [Zhang *et al.*, 2002]. Более того, фермент РРК 2 как правило осуществляет именно гидролиз полифосфатов, поскольку его способность гидролизовать полифосфат в 75 раз выше, чем способность к синтезу полифосфата [Ishige *et al.*, 2002]. Некоторые бактерии способны синтезировать оба фермента, как, например, микобактерии, в том числе и патогенный *M. tuberculosis* [Rijal *et al.*, 2020], но большинство синтезируют только один фермент, РРК 1 или РРК 2, например, *E. coli* синтезирует только РРК 1 [Ahn, Kornberg, 1990].

Исследования путей регуляции синтеза полифосфатов начались в 90-х годах двадцатого века [Ault-Riche *et al.*, 1998]. Тогда же была описана первая модель регуляции синтеза полифосфатов, где ключевую роль играл алармон стринджент ответа – гуанозин тетрафосфат и пентафосфат (p)ppGpp, которые способны подавлять активность экзополифосфатазы, повышая, таким образом, количество полифосфатов в клетках [Rao *et al.*, 1998]. Данная модель долгое время оставалась общепринятой, но в последнее время появились данные, что индукция синтеза полифосфатов в *E. coli* не зависит от синтеза (p)ppGpp, но зависит от уровней РНК-полимеразы связывающего фактора DksA, а также альтернативных сигма-факторов RpoN и RpoE [Gray, 2019]. Тем не менее, алармон (p)ppGpp по-прежнему можно считать косвенным регулятором уровней полифосфатов в клетках, а также в межклеточном пространстве бактериальных колоний [Bowlin, Gray, 2021].

У патогенного *M. tuberculosis* синтез полифосфатов опосредован активностью двух полифосфаткиназ РРК 1 и РРК 2. Тем не менее, основную работу по синтезу PolyP осуществляет РРК 1, которая работает вместе с двухкомпонентной системой SenX3-RegX3, доставляющей фосфаты [Parish, 2014; Namugenyi *et al.*, 2017]. Полифосфаткиназа 2, как упоминалось выше, несмотря на то, что в силу исторически сложившегося названия, в первую очередь проявляет гидролазную активность, но способна осуществлять синтез полифосфата из ГТФ. Кроме того, у микобактерий существуют две экзополифосфатазы РРХ 1 (exopolyphosphatase) и РРХ 2. Первая нацелена на гидролиз короткоцепочечных

молекул полифосфатов [Sureka *et al.*, 2007], а вторая гидролизует длинные цепи [Sureka *et al.*, 2009]. Регуляция синтеза полифосфатов алармоном гуанозин тетра- и пентафосфатом (p)ppGpp у микобактерий осуществляется так же, как и у *E. coli* – алармон подавляет активность обеих гидролаз, что приводит к повышению уровней полифосфатов в клетках, которые, в свою очередь, стимулируют продукцию альтернативного сигма-фактора стационарной фазы и инициации стринджен-ответа. У микобактерий полифосфаты, в свою очередь, также усиливают продукцию алармона, что приводит к положительной обратной связи. Полифосфат служит донором для гистидинкиназы MprB, которая уже фосфорилирует MprA. MprA регулирует активность сигма фактора *sigE*, который иницирует транскрипцию алармонсинтетазы – гена *rel* [Sureka *et al.*, 2007; Danchik *et al.*, 2021].

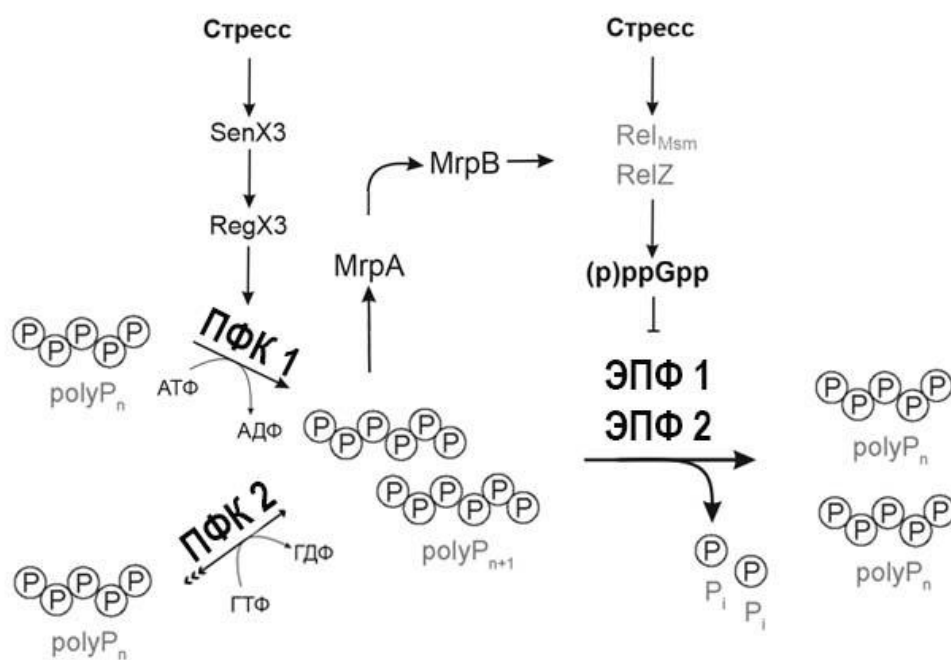


Рисунок 3. Схема пути регуляции синтеза и гидролиза полифосфатов в клетках *M. smegmatis*.

У непатогенного *M. smegmatis* пути регуляции полифосфатов схожи с *M. tuberculosis*. Количество полифосфатов также регулируется алармоном (p)ppGpp, но у него, в свою очередь, существуют две алармонсинтетазы: большая синтетаза Rel_{Msm} и малая синтетаза RelZ. Большая синтетаза помимо функции синтеза,

способна также гидролизовать алармон [Tkachenko *et al.*, 2021]. И, как у патогенного организма, у *M. smegmatis* есть двухкомпонентные системы MprAB и SenX3-RegX3 [Parish, 2014], выполняющие аналогичные функции (Рисунок 3).

1.4.3 Функции полифосфатов

Долгое время функции полифосфатов оставались неизученными, а сами молекулы считались «молекулярными ископаемыми» [Kornberg *et al.*, 1999]. Тем не менее, за последние 20 лет накопилось множество данных, демонстрирующих участие полифосфатов в следующих функциях: накопление энергии [Achbergerova *et al.*, 2011], модуляция метаболизма [Rao *et al.*, 2009], реакция на стресс [Tunpiboonsak *et al.*, 2010], поддержание жизнеспособности [Rao, Kornberg, 1996], патогенность [Candon *et al.*, 2007], подвижность [Rashid *et al.*, 2000; Tunpiboonsak *et al.*, 2010], устойчивость к антибиотикам [Ortiz-Severin *et al.*, 2015]. Также полифосфаты выполняют регуляторную роль во множестве процессов эукариотических клеток [Morrissey *et al.*, 2012; Suess *et al.*, 2019] и архей [Paula *et al.*, 2019]. Такая глубокая интеграция в процессы жизнедеятельности организмов является причиной неуклонно растущего интереса исследователей к данным молекулам, а также представления полифосфатов как перспективной мишени для борьбы с патогенными организмами.

1.4.4 Влияние полифосфатов на физиологические процессы бактерий

При обсуждении влияния полифосфатов на рост и деление клеток было отмечено, что данные молекулы способны модулировать и направлять активность Lon-протеазы бактерий, которая осуществляет контроль за протеомом бактерий, гидролизуя белки с дефектами в третичных структурах, во время строгого ответа. Это позволяет клеткам в течение продолжительного действия неблагоприятных факторов среды не тратить ресурсы на неэффективные для данной ситуации процессы деления, а сконцентрироваться на выживании. Помимо регуляции синтеза белков, полифосфаты способны активировать деградацию рибосомальных белков протеазой, способствуя восстановлению после аминокислотного голодания [Kuroda, 2006; Nomura *et al.*, 2004]. Согласно исследованиям, полифосфаты

участвуют в регуляции общей сети реакции на стресс у многих видов бактерий [Shiba *et al.*, 1997]. Полифосфаты необходимы для транскрипции гена *rpoS* [Maciag *et al.*, 2011]. Кроме того, полифосфаты способны действовать как шапероны, поддерживая конформацию белков и предотвращая их развертывание. У полифосфатов даже есть преимущество над другими шаперонами, поскольку данная молекула не требует гидролиза АТФ для поддержания активности [Gray *et al.*, 2014].

Регуляция активности Lon протеазы полифосфатами, основного фермента разрушающего белки, модулирует скорость деления клеток. Такая зависимость была продемонстрирована для *E. coli*. Кроме того, недавно было обнаружено, что полифосфаты также регулируют инициацию репликации ДНК, действуя на Lon протеазу во время стринджент ответа на стресс у *E. coli* [Gross, Konieczny, 2020]. Было продемонстрировано, как полифосфаты активируют протеазу и нацеливают её на деградацию белка инициации репликации DnaA. Связанные с АДФ белки DnaA иницируют репликацию, в то время как связанные с АТФ являются репрессорами репликации. Полифосфаты, в свою очередь, избирательно способны связываться с DnaA-АДФ, после чего такую молекулу расщепляет Lon протеаза [Liu *et al.*, 2019].

Известно, что полифосфаты необходимы для формирования свойств вирулентности патогенных бактерий [Candon *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2012; Srisanga *et al.*, 2019]. Например, установлено, что полифосфаты в клетках *Salmonella enterica serovar Typhimurium* повышают вирулентность и выживаемость данного патогена в амебе *Dictyostelium discoideum*. Бактериальный мутант с делецией гена *ppk* терял способность реплицироваться и перемещаться в организме хозяина. При снижении выживаемости бактерий одновременно снижалась патогенность микроорганизма [Varas *et al.*, 2018].

Имеются данные о прямой зависимости между концентрацией полифосфатов в патогенных клетках *E. coli* и продукцией токсина колибактина. Делеция гена *ppk* или же его ингибирование химическим путем с помощью мезаламина снижало

экспрессию промотора, регулирующего синтез колибактина [Tang-Fichaux *et al.*, 2020].

Концентрация полифосфатов в бактериальных клетках повышается за счёт накопления алармона гуанозин пента-тетрафосфата или (p)ppGpp. Данная молекула является вторичным мессенджером, контролирующим метаболизм клетки, адаптацию к стрессам, а также переход к дормантному состоянию как следствие замедления метаболизма. При этом клетка становится невосприимчивой к множеству стрессоров, в том числе к антибиотикам. Увеличение концентрации алармона ингибирует экзополифосфатазу, гидролизующую полифосфатные цепи, что, в свою очередь, инициирует процессы адаптации микроорганизмов. Более того, взаимодействие полифосфатов с Lon-протеазой препятствует расщеплению токсинов – компонентов токсин-антитоксин системы, что в конечном итоге приводит к формированию персистенции [Gerdes, Maisonneuve, 2012].

Существуют и обратные примеры, демонстрирующие связь между синтезом полифосфатов и снижением экспрессии генов патогенности. Например, у *Francisella tularensis* существует кластер генов патогенности, названный «остров патогенности *Francisella* (FPI)», а также гены *ppk*, кодирующие обе полифосфаткиназы. Установлено, что штамм с делецией гена *ppk* демонстрировал повышенную экспрессию генов FPI. Таким образом, экспрессия *ppk* фактически препятствует патогенности самой бактерии [Rohlfing *et al.*, 2018].

Патогенные микобактерии *M. tuberculosis* способны поддерживать определенный уровень внеклеточной концентрации полифосфатов. Показано, что таким образом бактериальные клетки модулируют активность фагосом и лизосом, подавляя иммунитет хозяина [Rijal *et al.*, 2020]. Известны и другие патогенные бактерии, секретирующие полифосфаты и поддерживающие определенный уровень внеклеточных полифосфатов с аналогичной целью [Noegel, Gotschlich, 1983; Neilands, Kinnby, 2020].

Экспериментальные данные, полученные при исследовании разных видов бактерий, демонстрируют важность полифосфатов как для образования биоплёнок, так и транслокации. Данный факт может быть обусловлен глубокой интеграцией

полифосфатов в физиологические процессы бактерий и участием в регуляции процессов восприятия клетками окружающей среды. Существует множество подтверждений, что полифосфаты необходимы для подвижности, биоплёнкообразования и спорообразования у таких видов как *Bacillus cereus* [Shi *et al.*, 2004], *P. aeruginosa* [Rashid *et al.*, 2000] и *E. coli* [Grillo-Puertas *et al.*, 2012]. Во всех случаях мутантные штаммы данных видов, дефицитные по полифосфатам, демонстрировали нарушения во всех названных процессах.

Таким образом, на данный момент известно о реальной роли полифосфатов в физиологических процессах бактерий. Благодаря доказанному влиянию полифосфатов на вирулентность и выживаемость, в том числе патогенных микроорганизмов, полифосфаты и ферменты их синтеза являются перспективными мишенями в разработке новых антибактериальных препаратов.

1.5 Физиологические функции биогенных полиаминов у бактерий

1.5.1 Характеристика полиаминов

Биогенные полиамины представляют собой алифатические поликатионы, имеющие в своём составе несколько амина и иминогрупп. Можно выделить четыре основных типа биогенных полиаминов, которые наиболее широко представлены в клетках и тканях живых организмов. К ним относятся путресцин, кадаверин, спермидин и спермин (Рисунок 4). Кроме того, к менее распространенным полиаминам относятся агматин, норспермин, ацетилспермидин и некоторые другие [Michael, 2016].

Полиамины присутствуют в клетках и тканях большинства живых организмов, включая человека, некоторые ткани и органы которого характеризуются довольно высоким содержанием этих метаболитов.

В клетках большинства прокариот преобладают путресцин и кадаверин, кроме того, бактерии не способны синтезировать спермин, в то время как эукариотические клетки продуцируют в основном спермидин и спермин [Igarashi, Kashiwagi, 2010]. Микобактерии утратили способность к самостоятельному

синтезу полиаминов, но способны транспортировать их из внешней среды [Замахеев и др. 2018].

Путресцин является предшественником для большинства биогенных полиаминов и может синтезироваться посредством прямого декарбоксилирования орнитина ферментом орнитиндекарбоксилазой (ОДК). Второй путь синтеза путресцина представляет собой декарбоксилирование аргинина аргининдекарбоксилазой (АДК) с образованием агматина, который затем при участии агматинуреогидролазы гидролизуется до мочевины и путресцина. В клетках *E. coli* синтез путресцина осуществляется преимущественно из орнитина [Morris, 1969].

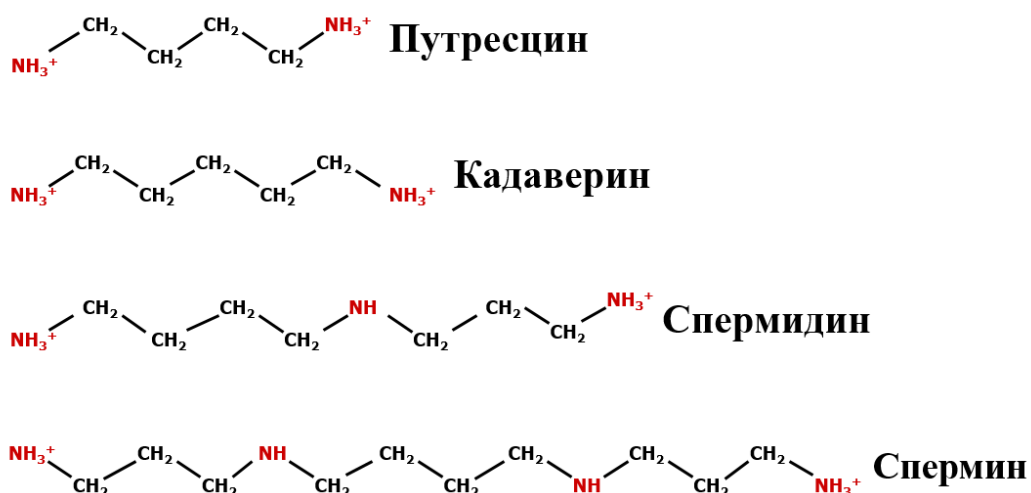


Рисунок 4. Наиболее широко распространённые биогенные полиамины.

Спермидин синтезируется из L-метионина, который последовательно проходит через реакции аденилирования и декарбоксилирования. Спермин может образовываться в результате переноса еще одного аминопропильного фрагмента на спермидин в условиях высокого содержания спермидина и при щелочном pH. Кадаверин в клетках *E. coli* синтезируется в результате реакции декарбоксилирования лизина [Tabor, 1985; Rhee *et al.*, 2007].

1.5.2 Основные функции полиаминов

Необходимость полиаминов для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов впервые была показана на примере изучения их влияния на

параметры роста культур *E. coli* [Tabor, 1985]. Мутантные штаммы, не способные синтезировать полиамины, характеризуются низкой скоростью роста или его полным отсутствием. Возобновление нормального деления таких клеток происходит только после внесения экзогенных полиаминов. Даже при росте на минимальных средах, бактерии способны поддерживать миллимолярные концентрации внутриклеточных полиаминов, что свидетельствует об их важности для нормального протекания процессов жизнедеятельности [Tabor, 1985].

Участие полиаминов в основных клеточных процессах обусловлено особенностями их молекулярной структуры. При физиологических значениях pH полиамины протонированы по атомам азота. Через ионные взаимодействия они могут связываться с отрицательно заряженными компонентами клетки: нуклеиновыми кислотами, белками и фосфолипидами. Кроме того, полиамины способны образовывать водородные связи [Tabor, 1985].

Под влиянием стрессовых факторов содержание полиаминов у микроорганизмов значительно изменяется. Полиамины, участвуют в поддержании нативной конформации нуклеиновых кислот, а также могут вступать в конкурентные взаимоотношения с ионами калия за места связывания с полианионными компонентами клетки, и в первую очередь с ДНК. Установлено, что обмен этих ионов между клеткой и средой происходит взаимосвязано, что обеспечивает поддержание их баланса в клетке. Предполагается, что это способствует процессу регуляции топологии ДНК в ответ на действие неблагоприятных факторов среды [Ткаченко *и др.*, 1997, Ткаченко *и др.*, 1998]. Противоположно направленные потоки путресцина и калия между клеткой и средой, вызывающие изменения экспрессии адаптивных генов, обнаружены также в случае голодания по аммонии и при гиперосмотическом шоке [Ткаченко *и др.*, 1997, Ткаченко *и др.*, 1998]. Наряду с прямым стимулирующим действием на суперспирализацию ДНК, регуляторный эффект путресцина может быть обусловлен ингибированием активности релаксирующего фермента ДНК-топоизомеразы. Необходимость полиаминов установлена также для функционирования ДНК-топоизомеразы II [Rhee *et al.*, 2007].

В работах А.Г. Ткаченко с соавторами было установлено, что энергетический статус клетки влияет на активность системы синтеза полиаминов, которая может рассматриваться как одна из точек сопряжения энергетического и конструктивного метаболизма. Вместе с тем, при некоторых видах стрессовых воздействий было показано влияние полиаминов на поддержание баланса катионов в клетке [Ткаченко *и др.* 1998; Ткаченко *и др.* 1999] и продемонстрировано существование зависимости между содержанием полиаминов в клетке и топологическим состоянием ДНК [Ткаченко *и др.* 1996; Ткаченко *и др.* 1998]. Это можно рассматривать как стратегию, направленную на формирование преадаптации к неблагоприятным воздействиям посредством повышения промоторной активности генов при увеличении отрицательной суперскрученности ДНК [Ткаченко *и др.* 1997].

Экспериментально доказана роль путресцина в защите клеток от окислительного стресса, обусловленного действием перекиси водорода [Jung *et al.*, 2003] и супероксидного радикала [Ткаченко, Федотова, 2007], [Tkachenko *et al.*, 2001]. При этом путресцин может оказывать как прямое воздействие на экспрессию адаптивных генов или транскрипционных регуляторов, так и опосредованное через изменение топологии ДНК [Ткаченко, Нестерова, 2003].

Кроме того, известно участие полиаминов в регуляции экспрессии *gadA* и *gadB* генов, кодирующих глутамат-декарбоксилазы *E. coli*, необходимые для выживания при действии кислот. Обнаружено, что полиамины, стимулируя синтез аденилатциклазы на уровне трансляции, повышают количество σ^S и σ^F альтернативных субъединиц РНК-полимеразы, что увеличивает их конкурентный потенциал за связывание с корфферментом и способствует адаптации *E. coli* к стрессу [Yoshida *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2004].

Полиамины играют важную роль в жизнедеятельности организмов, напрямую или опосредованно, влияя на множество процессов. Например, полиамины, находящиеся в клетках *E. coli* по большей части в виде комплекса полиамин-РНК, стимулируют пролиферацию клеток (0,6 мМ путресцина ускоряли

рост в 3 раза), сборку 30S субъединиц рРНК, увеличивая скорость синтеза белков в 1,5-2 раза. Полиамины стимулируют синтез 20 белков, входящих в «полиаминовый модулон», вызывая структурные изменения в последовательности Шайна-Дальгарна и сближая её с кодоном AUG, а также способствуя формированию иницирующего комплекса для связывания с сигма субъединицами. Белки полиаминового модулона способствуют оптимизации роста в логарифмической фазе, поддерживают жизнеспособность клеток в стационарной фазе. Кроме того, они участвуют в регуляции рН посредством воздействия на путресцин-орнитин (PotE) и кадаверин-лизин (CadB) антипортеры [Igarashi, Kashiwagi, 2018]. *A. tumefaciens* также для роста нужны спермидин, диаминопропан, аминопропилированные формы путресцина и кадаверина (вероятно, это связано с наличием 1,3-диаминопропановой группировки) [Kim et al., 2015]. Диаминопропан и спермидин в концентрации 5 мМ увеличивают скорость роста, продукцию цефалоспоринов С и пигментацию грибка *Acremonium chrysogenum* [Жгун, 2015]. *Vibrio spp.* продуцирует норспермидин – аналог спермидина, синтезируемый благодаря ферментам карбоксил-спермидинсинтаза (CANSDH) и карбоксил-спермидиндекарбоксилаза (CANSDC). Отключение любого или обоих генов сразу, кодирующих данные ферменты, приводит к замедлению роста планктонной культуры, и биоплёнок [Di Martino et al., 2013; Sobe et al., 2017].

При физиологических значениях рН полиамины протонированы по атомам азота. Такое состояние дает им возможность связываться с отрицательно заряженными компонентами клетки, нуклеиновыми кислотами, белками и фосфолипидами, ДНК и РНК [Tabor, 1985]. Благодаря этому полиамины участвуют в поддержании нативной конформации нуклеиновых кислот, а также могут вступать в конкурентные взаимоотношения с ионами калия за места связывания с ДНК. Установлено, что обмен этих ионов между клеткой и средой взаимосвязан, что обеспечивает поддержание баланса катионов в клетке. Предполагается, что это способствует регуляции топологии ДНК в ответ на действие неблагоприятных факторов среды [Ткаченко и др., 1997]. Наряду с прямым стимулирующим

действием на суперспирализацию ДНК, регуляторный эффект путресцина может быть обусловлен ингибированием активности релаксирующего фермента ДНК-топоизомеразы. Необходимость полиаминов была установлена и для функционирования ДНК-топоизомеразы II [Rhee *et al.*, 2007].

Полиамины выполняют и протекторную функцию, снижая чувствительность бактерий к антибиотикам [Tkachenko *et al.*, 2012] (в частности, к фторхинолону левофлоксацину), стабилизируя сферопласты и протопласты [Igarashi, Kashiwagi, 2018], а также напрямую связываясь с ДНК и предотвращая её повреждения. Эффект стабилизации мембран, обеспечиваемый кадаверином, защищает клетки от активных форм кислорода, осмотического шока [Igarashi, Kashiwagi, 2018], гипоксии [Сизова, 2014] и других неблагоприятных факторов среды. Полиамины индуцируют гены *gadA* и *gadB* глутамат-зависимой системы защиты для выживания при действии кислот [Pegg, 2018]. Обнаружено, что полиамины, стимулируя синтез аденилатциклазы на уровне трансляции, повышают количество σ^S и σ^F альтернативных субъединиц РНК-полимеразы, что также способствует адаптации *E. coli* к стрессу [Yoshida *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2004].

Экспериментально доказана роль полиаминов в защите клеток от окислительного стресса, обусловленного действием перекиси водорода и супероксидного радикала [Tkachenko *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003; Ткаченко, Федотова, 2007]. При этом путресцин может оказывать как прямое воздействие на экспрессию адаптивных генов или транскрипционных регуляторов, так и опосредованное через изменение топологии ДНК [Ткаченко, Федотова, 2007].

1.5.3 Влияние экзогенных полиаминов на патогенность бактерий.

Полиамины играют важную роль и в жизни патогенных микроорганизмов: усиливают вирулентность [Jelsbak *et al.*, 2012], модулируют биоплёнкообразование [Cardile *et al.*, 2017; Sobe *et al.*, 2017], защищают от клеток иммунной системы [Di Martino *et al.*, 2013]. Примечательно, что некоторые бактерии научились использовать полиамины, которые синтезируются клетками хозяина. Например, путресцин и спермидин обеспечивают вирулентность *S. typhimurium* и других

видов, таких как, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila* и *Shigella spp.* У *S. typhimurium* есть два локуса вирулентности SPI1 и SPI2. Локус SPI1 необходим для проникновения в клетки, а SPI2 позволяет размножаться внутри клеток-хозяев. Было установлено, что полиамин-дефицитные мутанты теряли способность к инвазии и к размножению внутри клеток, но добавление экзогенного путресцина и спермидина восстанавливало работу локусов, увеличивая уровень экспрессии генов [Jelsbak *et al.*, 2012]. Бактерии из рода *Shigella* в ходе эволюции лишились возможности синтеза кадаверина, что положительно сказалось на их вирулентности, так как кадаверин защищает слизистую оболочку толстого кишечника от энтеротоксинов ShET1 / ShET2, а также стабилизирует эндосомную мембрану, препятствуя выходу *Shigella* в цитоплазму клеток-хозяев. В то же время эти бактерии накапливают спермидин, благодаря отсутствию генов спермидинацетилтрансферазы и, таким образом, обеспечивают себе повышенную устойчивость к воздействию перекиси водорода макрофагов [Di Martino *et al.*, 2013].

Однако наличие больших (миллимолярных) концентраций в среде может являться и негативным сигналом для микроорганизмов. Так, например, клетки *E. coli* при воздействии на них спермидина (1-10 мМ) улавливали данный поликатион через минорный рецептор Trg и изменяли направление хемотаксиса, стараясь избегать областей с большими его концентрациями [Joana, Sourjik, 2018]. Помимо этого, полиамины, в том числе норспермидин, подавляют биоплёнкообразование у *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* [Cardile *et al.*, 2017]. Тот факт, что все перечисленные виды, биоплёнкообразование которых снижается при воздействии полиаминов, являются патогенными бактериями, свидетельствует о том, что организм хозяина может использовать высокие концентрации полиаминов для своей защиты. Однако некоторые бактерии смогли адаптироваться к подобным условиям и даже использовать их в противостоянии с иммунной системой организма хозяина. Например, известно, что полиамины ингибируют рост *S. aureus*, но у данного микроорганизма присутствует ген *speG*, кодирующий спермидинацетилтрансферазу, которая позволяет

инактивировать экзогенные полиамины в клетках хозяев [Di Martino *et al.*, 2013; Li, He, 2019].

Бактерии *Helicobacter pylori* сами не производят полиаминов, но манипулируют метаболизмом макрофагов и таким образом провоцируют их апоптоз. Макрофаги при взаимодействии с *H. pylori* активируют аргиназу II, орнитиндекарбоксилазу и сперминоксидазу [Chaturvedi *et al.*, 2010]. В ответ на это клетки-патогены высвобождают L-аргинин, он попадает в иммунные клетки, метаболизируется ферментами макрофага и превращается в путресцин. Повышенное содержание путресцина и других полиаминов, синтезируемых из него, запускает апоптоз макрофагов, высвобождение перекиси водорода и деполяризацию митохондриальной мембраны [Di Martino *et al.*, 2013].

1.5.4 Влияние экзогенных полиаминов на микобактерии.

Показано, что путресцин, спермидин и спермин окисляются клетками *M. smegmatis*, при этом присутствие спермина ускоряет процесс окисления остальных полиаминов. Показано, что изониазид способен ингибировать окисление спермина, а дигидрострептомицин – всех трёх полиаминов (путресцин, спермидин и спермин) [Bachrach *et al.*, 1960].

В то же время, указанные полиамины способны стимулировать активность синтеза РНК у микобактерий. При этом спермин влияет на активность в фазах инициации и элонгации, а спермидин стимулирует синтез мРНК в процессе ее элонгации, но не оказывает влияния на инициацию [Jain, 1987]. Известно также, что полиамины путресцин, спермидин и спермин блокируют пориновый канал mpr у *M. tuberculosis*, и предотвращают проникновение антибиотика в клетку [Speer *et al.*, 2013].

Таким образом, актуальность исследования полиаминов складывается как из широкого распространения данных молекул в окружающей среде, в том числе в тканях многоклеточных, так и из их способности модулировать внутрибактериальные процессы, в том числе адаптацию к действию антибиотиков или других антибактериальных препаратов, и коллективные реакции

бактериальных сообществ (биоплёнкообразование). А разработка новых стратегий антибактериальной терапии, учитывающих не только эффективность самих антибиотиков, но и влияние на процесс таких внешних факторов, как биогенные полиамины, позволит повысить их эффективность.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Бактериальные штаммы, использованные в работе, перечислены в Таблице 1. Непатогенный быстрорастущий штамм *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 является стандартным модельным объектом для изучения физиологии медленно растущих микобактерий [Sparks et al., 2023] благодаря идентичности белков-ортологов с патогенными *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. marinum*, *M. avium*, и *M. leprae* [Malhotra S., Vedithi S.C., Blundell T.L., 2017]. Поэтому данный штамм был выбран в качестве объекта данной диссертационной работы.

Таблица 1 – Список использованных штаммов бактерий

Штамм	Описание	Источник
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	Штамм дикого типа	Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, АТСС #700084
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 pMind:: <i>rel</i> _{Msm}	Штамм со сверхэкспрессией Rel _{Msm}	Коллекция Лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН Штаммы сконструированы сотрудником лаборатории адаптации микроорганизмов Сидоровым Р.Ю. [Tkachenko et al., 2021]
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 Δ <i>rel</i> _{Msm}	Штамм с одиночной делецией <i>rel</i> _{Msm}	
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 Δ <i>rel</i> _{Msm} pMind:: <i>rel</i> _{Msm}	Комплементированный штамм с одиночной делецией <i>rel</i> _{Msm} и сверхэкспрессией Rel _{Msm}	
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 Δ <i>rel</i> _{Msm} Δ <i>relZ</i>	Штамм с двойной делецией генов <i>rel</i> _{Msm} и <i>relZ</i>	
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 Δ <i>rel</i> _{Msm} Δ <i>relZ</i> pMind:: <i>rel</i> _{Msm}	Комплементированный штамм с двойной делецией <i>rel</i> _{Msm} и <i>relZ</i> и сверхэкспрессией RelZ	

2.2 Питательные среды и условия культивирования

Культивирование штаммов *Mycobacterium smegmatis* проводили на питательной среде Middlebrook 7H9 (BD). Состав (г/1000 мл): аммония сульфат – 0,5, L-глутаминовая кислота – 0,5, калия дигидрофосфат – 1, натрия цитрат – 0,1,

железа аммонийного цитрат – 0,04, магния сульфат – 0,05, кальция хлорид – 0,0005, цинка сульфат – 0,001, меди сульфат – 0,001, пиридоксин – 0,001, биотин – 0,0005. Конечное значение pH – 6,6. Перед автоклавированием в среду вносили источник углерода – глицерин – 4,4 мл на 1 л.

Среду автоклавировали при 1 атмосфере в течение 60 минут.

Для исследования скольжения штаммов *M. smegmatis*, в питательную среду дополнительно вносили агарозу в количестве 0,3% от конечного объёма среды. Из состава среды исключен глицерин, а режим автоклавирования сокращён до 10 минут при 1 атмосфере для предотвращения испарения.

Культуры различных штаммов *M. smegmatis*, сохраняемых в лабораторной коллекции, до начала эксперимента выращивали на агаризованной среде LB («Sigma», США) в чашках Петри и сохраняли не более двух недель. Для эксперимента несколько колоний переносили в пробирку с 5 мл жидкой среды Middlebrook 7H9, содержащей ампициллин в конечной концентрации 25 мкг/мл, и 5% раствор Твин-80 в пропорции 1:100 для предотвращения агрегации клеток. Пробирки культивировали в течение 24 часов в термостатируемом шейкере GFL 1092 (37°C, 200 об/мин). Выраженный инокулят переносили в колбу Эрленмейера, содержащую 30-50 мл среды Middlebrook 7H9 с добавкой ампициллина и твина-80. Количество биомассы в инокуляте, доводили до оптической плотности 0,02 (600 нм) с помощью спектрофотометра Shimadzu UV 1280. Клетки культивировали в термостатируемом шейкере (37°C, 200 об/мин) до нужного значения оптической плотности, чтобы добиться стандартного физиологического состояния культуры в экспериментах. Для исследования влияния полиаминов на рост *M. smegmatis*, также на содержание в клетках полифосфатов и гликопептидолипидов, исследуемые полиамины вносили в среду перед началом культивирования до конечной 2 mM концентрации. Контроль роста бактериальной культуры осуществляли путём измерения оптической плотности с помощью спектрофотометра SHIMADZU UV-1280. При необходимости оптическую плотность культуры доводили до необходимого уровня путём внесения физиологического раствора или среды Middlebrook 7H9.

2.3 Метод культивирования поверхностных биоплёнок *M. smegmatis*

Культуру микобактерий, выращенных до оптической плотности $\approx 3,5$ (600 нм), отмывали от среды культивирования центрифугированием (5 мин, 16 000 об/мин) и разводили в питательной среде Middlebrook 7H9 до оптической плотности культуры 1,0 (600 нм) (инокулят). 500 мкл инокулята вносили в предварительно взвешенную пластиковую чашку Петри диаметром 40 мм (Медполимер, Россия) и добавляли 4,5 мл питательной среды Middlebrook 7H9, содержащей необходимое количество антибиотиков и/или полиаминов (указано в подписях к рисунку/таблице), до конечной оптической плотности культуры 0,1 (600 нм). Чашки герметизировали парафильмом и помещали в термостат на 72 часа при 37°C. Выращенные биоплёнки фотографировали на цифровую камеру («Olympus», Япония), после чего с помощью шприца из чашки удаляли планктонную жидкость, а чашки с биоплёнкой высушивали до постоянного веса в термостате (37°C) и повторно взвешивали. Массу биоплёнки определяли как разность веса чашки с высохшей биоплёнкой и массы чашки до выращивания. В случае, если биоплёнка в чашке отсутствовала, отмечали минимальную концентрацию антибиотика, при которой пропадала биоплёнка, а планктонную жидкость использовали для посева на КОЕ, чтобы определить минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).

2.4 Метод культивирования скользящих колоний *M. smegmatis*

Для подготовки культуры к определению клетки микобактерий отмывали центрифугированием (5 мин, 16 000 об/мин) и разводили в физиологическом растворе до оптической плотности 0,2 (600 нм). Полученную суспензию бактерий наносили в объёме 0,5 мкл на поверхность заранее приготовленной агаризованной среды Middlebrook без глицерина [Martínez et al., 1999]. Ждали, пока капля впитается в агар, после чего чашку Петри помещали в герметичный контейнер с постоянным поддержанием относительной влажности 50% [Martínez et al., 1999]. Контейнер помещали в термостат на 16 часов при 37°C. Выросшие скользящие колонии фотографировали с помощью цифровой камеры («Olympus», Япония),

площади скользящих колоний определяли путем компьютерной обработки результатов фотографирования с помощью программы Adobe Photoshop CC 2015.5.

2.5 Определение чувствительности *M. smegmatis* к антибиотикам

Для определения МПК антибиотиков в отношении *M. smegmatis*, в 96-луночных планшетах готовили серийные двукратные разведения антибиотиков в среде Middlebrook 7H9 в объёме 200 мкл. Планшеты выдерживали в термостате при 37°C в течение 72 часов, после чего оценивали рост микобактерий. За МПК принимали минимальную концентрацию антибиотика, при которой отсутствовал рост микобактерий в лунке.

Для учёта возможного влияния антибиотика на рост культур *M. smegmatis*, использовали модифицированный метод определения численности колониеобразующих микроорганизмов, предложенный Веслополовой [Веслополова, 1995]. Суть его состоит в том, что через 24 часа культивирования, из лунок отбирали по 50 мкл аликвот культур, и переносили в пробирки с 450 мкл физиологического раствора для получения десятичных разведений. Из соответствующего десятичного разведения делали высевы по 10 мкл на плотную агаризованную среду LB (Sigma, США). Чашки помещали в термостат на 72 часа при температуре 37°C. После проращивания культур микобактерий на агаризованной среде, выбирали разведения, в которых можно было подсчитать количество колоний, образованных клетками. Количество КОЕ, приходящееся на 1 мл среды подсчитывали по следующей формуле: ЧИСЛО КОЛОНИЙ × СТЕПЕНЬ РАЗВЕДЕНИЯ × 100.

2.6 Определение размеров агрегатов клеток у штаммов *M. smegmatis*

Для определения размеров агрегатов клеток штаммов микобактерий, а также влияния полиаминов на данный процесс, 5 мкл клеточной культуры помещали в камеру Горяева и спустя 2 минуты исследовали под микроскопом. Поскольку просмотр объектов в камере Горяева исключает возможность окрашивания клеток по Грамму, для микроскопии использовался метод фазового контраста. Для наблюдения агрегатов использовали оборудование для фазового контраста ФАТЕК

6-7 («ЛОМО», Россия) на микроскопе МИКМЕД-6 («ЛОМО», Россия). Фотографирование агрегатов на фоне малых квадратов камеры Горяева осуществляли при помощи камеры для микроскопа МС 6.3 («ЛОМО», Россия).

С помощью программы Adobe Photoshop CC 2015.5 (Adobe, США) проводили измерение площадей агрегатов. Инструментом «выделение» определяли длину ребра малого квадрата в пикселях у камеры Горяева. По значению длины ребра малого квадрата камеры Горяева, устанавливали размер и площадь (мкМ), которая соответствует одному пикселю на фото. С помощью инструмента «умное выделение» определяли количество пикселей, которое занимает агрегат, и вычисляли его площадь.

2.7 Флуориметрический метод определения полиаминов с использованием тонкослойной хроматографии

С целью подготовки бактериальной культуры для исследования в колбу со средой LB и инокулятом добавляли один из предшественников синтеза путресцина: агматин, орнитин или аргинин (Sigma, США) до конечной концентрации 10 мг/мл. Затем колбу с культурой помещали в термостатируемый шейкер на 72 часа при 200 об/мин и 37°C. Для анализа отбирали 1 мл культуры, клетки отмывали от среды и ресуспендировали в 200 мкл физиологического раствора в стеклянных ампулах, добавляя 600 мкл 10Н HCl. Гидролиз клеток проводили в запаянных ампулах, подвергая термической обработке в течение 12 часов в сухожаровом шкафу при температуре 110 °C. После гидролиза ампулы вскрывали, вносили 700 мкл насыщенного раствора Na₂CO₃ для нейтрализации pH.

Количественную оценку полиаминов в клетках микобактерий проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [Tkachenko, Pozhidaeva, Shumkov 2006; Ахова, Ткаченко, 2022]. В качестве метчииков готовили стандартный раствор полиаминов с известной концентрацией. Для этого полиамины путресцин, кадаверин, спермидин и спермин (Sigma, США) растворяли в 0,4Н HClO₄ до конечной концентрации 10 мМ. Полученные растворы полиаминов объединяли и дополнительно разводили 0,4Н раствором HClO₄ до конечной концентрация

каждого полиамина 200 мкМоль. Полученный раствор полиаминов использовали в качестве стандарта.

Конечное содержание полиаминов в пробе определяли флуориметрически. С этой целью 50 мкл опытной пробы, смешивали с 50 мкл 0,4N Na₂CO₃ и 100 мкл дансилхлорида в микропробирке. Смесь помещали в термостат и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C, после чего выпаривали. Стандартные растворы полиаминов подвергали той же обработке. После упаривания в микропробирку с высохшими пробами и стандартами добавляли 100 мкл бензола для растворения дансильированных полиаминов. Бензольный экстракт наносили на пластину для тонкослойной хроматографии Sorbfill («Имид», Россия) при помощи капилляра (10 мкл). На каждую пластину вместе с опытными пробами наносили стандарт полиаминов для последующей количественной оценки опытных проб. Пластины последовательно хроматографировали в хроматографической камере в двух системах:

Первая система: 20 мл бензола + 2 мл триэтиламина.

Вторая система: 10 мл бензола + 450 мкл метанола.

После разделения хроматограммы высушивали потоком теплого воздуха от вентилятора и фотографировали через желтый светофильтр на цифровую камеру Olympus C-3040 («Olimpus», Япония) при облучении пластины ультрафиолетовым светом, возбуждающим сине-зелёное свечение пятен дансильированных полиаминов. Величина и яркость пятен были пропорциональны их концентрации в пробе.

Для измерения концентрации полиаминов использовали компьютерную программу Adobe Photoshop CC 2015.5 (Adobe, США).

2.8 Определение содержания полиаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для анализа полиаминов методом ВЭЖХ выпаренные пробы экстрагировали ацетонитрилом. Хроматографическая система включала хроматограф LC-20A (Shimadzu, Япония); колонку Luna C18(2) размером 250 мм×4,6 мм, 5 мкм

(Phenomenex, США), предколонку C18 Securityguard, 4 мм×3 мм, 5 мкм («Phenomenex», США); флуоресцентный детектор RF-10A XL (Shimadzu, Япония). Длины волн экстинкции и эмиссии были установлены на 400 и 516 нм, соответственно. В качестве мобильной фазы использовали воду и ацетонитрил, которые подавались на колонку со скоростью 1 мл/мин в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 40 до 100% в течение 10 мин с последующим уравниванием в течение 10 мин 40%-ным ацетонитрилом. Количественный анализ проводили с использованием внешнего стандарта.

2.9 Количественная оценка содержания полифосфатов в клетках *M. smegmatis*

Периодическое культивирование *M. smegmatis* в жидких средах проводили стандартным методом (см. раздел 2.2 «Питательные среды и условия культивирования»). Определение содержания полифосфатов в клетках осуществляли флуориметрическим методом [Diaz, Ingall, 2010].

Для выделения полифосфатов из культуры отбирали пробы в объёме 2 мл, клетки отмывали от культуральной среды повторным центрифугированием (15 мин, 12 000 об/мин) в физиологическом растворе и экстрагировали 600 мкл 1М NaOH в течение 30 минут [Liu *et al.*, 2021]. Щелочную среду нейтрализовывали добавлением 400 мкл 1М HCl, осадок отделяли центрифугированием (15 мин, 12 000 об/мин). Супернатант разводили в 20 мМ буфере HEPES (pH 7.0) в соотношении 1:10 и использовали для анализа. С этой целью 180 мкл забуференной пробы вносили в лунку 96-луночного планшета и добавляли 20 мкл стокового раствора DAPI (100 мкМоль) (Sigma, США). Планшет выдерживали 10 минут при комнатной температуре на свету, для формирования комплекса полифосфат-DAPI, после чего производили измерение флуоресценции с помощью микропланшетного ридера INFINITE 200 (TECAN, Швейцария). Измерение флуоресценции полифосфатов проводили при длинах волн возбуждения 415 нм и излучения 550 нм [Aschar-Sobbi *et al.*, 2008; Diaz, Ingall, 2010]. Для пересчета интенсивности флуоресценции в количество полифосфатов использовали калибровочный график

[Diaz, Ingall, 2010] Содержание полифосфатов рассчитывали на 1 мг сухой биомассы.

С этой целью одновременно с отбором проб для анализа полифосфатов из культуры отбирали также пробы объемом 2 мл с целью определения уровня сухой биомассы. Клетки освобождали от среды путем фильтрования с помощью вакуумного насоса через предварительно взвешенные бактериальные фильтры ВЛАДИПОР МФАС-Б-4 с размером пор 0,22 мкм и диаметром фильтра 25 мм (ВЛАДИПОР, Россия). Для определения сухой биомассы фильтры с клетками высушивали до постоянного веса (16 часов, 105°C). Сушке подвергали также 5 контрольных фильтров, не использованных для фильтрования с целью последующего статистического вычисления коэффициента усыхания, представляющего собой отношение массы фильтра до сушки, к его массе после сушки. Коэффициент использовали для последующего вычисления чистой сухой массы клеток, осажденной на фильтре, как разность между массой высушенного фильтра с клетками микобактерий и массой фильтра без клеток.

2.10 Определение содержания гликопептидолипидов в штаммах *M. smegmatis*

Выращенные стандартным методом (см. раздел 2.2 «Питательные среды и условия культивирования») до поздней стационарной фазы (72 часа) бактериальные культуры микобактерий уравнивали по биомассе, концентрировали центрифугированием (20 мин., 3000 об/мин) и отмывали от питательной среды физиологическим раствором. Полученный клеточный осадок растворяли в смеси хлороформ:метанол (2:1) и разрушали в ультразвуковой бане (4 цикла по 30 минут при температуре 50°C). После этого пробы повторно центрифугировали (10 мин, 13000 об/мин), отбирали супернатант и смешивали его с дистиллированной водой в пропорции 1:1. После перемешивания органическую фазу отбирали для разделения методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для этого пробы полностью выпаривали и растворяли в смеси хлороформ:метанол (9:1). Пробы с ГПЛ наносили на пластины с силикагелем 60 («Merk», Германия). Для проведения ТСХ использовали систему хлороформ:метанол (9:1).

С целью определения количества полиаминов из значений яркостей стандартов полиаминов и опытных проб сначала вычитали значения яркости фона, а затем значения яркости, соответствующие опытной пробе стандарта. После этого вычисляли отношение яркости в пробе к значению, соответствующему яркости определенной концентрации полиаминов в стандартной пробе и умножали на коэффициент, полученный после учета всех разведений оригинальной пробы.

Количество гликопептидолипидов оценивали относительно контроля – родительского штамма без делений и присутствия полиаминов. Для измерения содержания ГПЛ в пробах использовали метод, аналогичный измерению полиаминов.

2.11 Определение гидрофобности бактериальной оболочки

Выращенные до оптической плотности 1,5 (600 нм) в соответствии с описанными ранее условиями культуры штаммов отмывали от питательной среды РУМ-буфером [McNeil, Dennison, Parish, 2017] и доводили до оптической плотности 0,8 (590 нм). Разведенную культуру клеток распределяли по 5 мл в стеклянные пробирки и добавляли гексадекан до 0,5% от общего объема, после чего интенсивно встряхивали в течение 15 секунд. После встряхивания пробы отстаивали в течение 30 минут, а затем измеряли оптическую плотность водной фазы на спектрофотометре (590 нм). Гидрофобность рассчитывали как процент клеток, оставшихся в водной фазе, по соотношению оптической плотности до и после экспозиции с гексадеканом. Таким образом, чем ниже процент оставшихся клеток – тем выше гидрофобность.

2.12 Исследование клеточной поверхности микобактерий методом атомно-силовой микроскопии

Для измерения уровня шероховатости поверхности микобактериальной клетки были использованы изображения, полученные с помощью атомно-силового микроскопа, входящего в состав комплекса NTEGRA Spectra — сканирующей головки Солвер ПРО-М (НТ-МДТ, Россия). Сканирование проводили в

полуконтактном режиме с использованием кантилеверов NSG 10-A, с характерной жесткостью 11,8 Н/м и радиусом кривизны зонда 10 нм, в области 20×20 мкм.

Обработку результатов сканирования осуществляли с помощью компьютерной программы Nova (НТ-МДТ, Россия). Для этого на полученных изображениях выделяли область измерения шероховатости, одинаковую для всех измерений. В нескольких областях клетки при помощи инструмента «анализ» получали значение средней шероховатости (S_a). После повторных измерений, проведенных на нескольких клетках, подсчитывали среднее значение шероховатости и вычисляли стандартное отклонение.

2.13 Компьютерная обработка фотоснимков с целью количественной оценки способности *M. smegmatis* к скольжению в присутствии антибиотиков и полиаминов

Для определения площади, занимаемой колонией на цифровой фотографии использовали инструмент «быстрое выделение» в программе Adobe Photoshop CS 2015.5 (Adobe, США). Для повышения точности измерения скользящую колонию выделяли вручную и подсчитывали число выделенных пикселей при помощи инструмента «гистограмма». Для этого предварительно измеряли диаметр чашки с помощью инструмента «выделение». Поскольку диаметр чашек был стабилен и составлял 40 мм, площадь одного пикселя высчитывалась как квадрат отношения диаметра чашки в миллиметрах к диаметру в пикселях. После этого площадь пикселя умножали на число пикселей, приходящихся на скользящую колонию.

Скорость продвижения бактериального монослоя определяли, вычисляя пройденное расстояние, на которое продвинулись клетки в течение 30 минут. Для этого чашку Петри с выращенной колонией фиксировали на предметном столике микроскопа МИКМЕД-6 («ЛОМО», Россия), а затем делали фотографии края монослоя колонии на камеру МС 6.3 («ЛОМО», Россия) с интервалом в 30 минут. Расстояние на фотографиях, измеряемое в пикселях, сравнивали с аналогичной фотографией малого квадрата камеры Горяева с известной длиной ребра (0,5 мкм), пересчитывая, таким образом, пройденное расстояние в микрометры. Для

вычисления скорости, пройденное расстояние делили на время, прошедшее между двумя снимками, после чего скорость пересчитывали в мкм/ч.

Для количественной оценки межклеточного пространства скользящей колонии фотографическое изображение бактериального монослоя изображение колонии, путём регулировки уровня контрастности и яркости трансформировали в монохромное (только «черные и белые пиксели»). Это давало возможность далее с помощью инструмента «гистограмма» оценить количество межклеточного пространства в монослое («белые пиксели»).

2.14 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., 2006). Результаты представлены либо значениями медианы, где вертикальными отрезками обозначены величины 25% и 75% процентилей, либо средними значениями, где вертикальными отрезками обозначены значения стандартной ошибки. Конкретный метод обозначения указан в подписях к рисункам. Оценку статистической значимости различий сравниваемых групп проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (сравнение двух независимых групп) или параметрического критерия Стьюдента (в тех случаях, когда объём выборки позволял это сделать). Конкретный метод оценки также указан в подписях к рисункам. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Исследование функций алармонсинтетаз в формировании биоплёнок и скольжении при переходе культуры *M. smegmatis* в стационарную фазу роста.

3.1.1 Влияние активности генов алармонсинтетаз на биопленкообразование микобактерий

Микобактерии формируют преимущественно поверхностные биоплёнки (пелликулы) на границе фаз: жидкая питательная среда – воздух [Ojha *et al.*, 2005]. Это позволяет визуально оценивать изменения их фенотипа. При исследовании поверхностных биоплёнок (см. раздел 2.3 «Метод культивирования поверхностных биоплёнок *M. smegmatis*») у штаммов с делециями генов *rel_{Msm}* и *relZ* мы обнаружили, что оба штамма утрачивают способность образовывать целостную поверхностную биоплёнку. При этом после начала формирования, поверхность пелликул фрагментировалась и отдельные части теряли плавучесть и оседали на дно. Штамм без делеций, напротив, формировал устойчивую целостную биоплёнку (Рисунок 5).

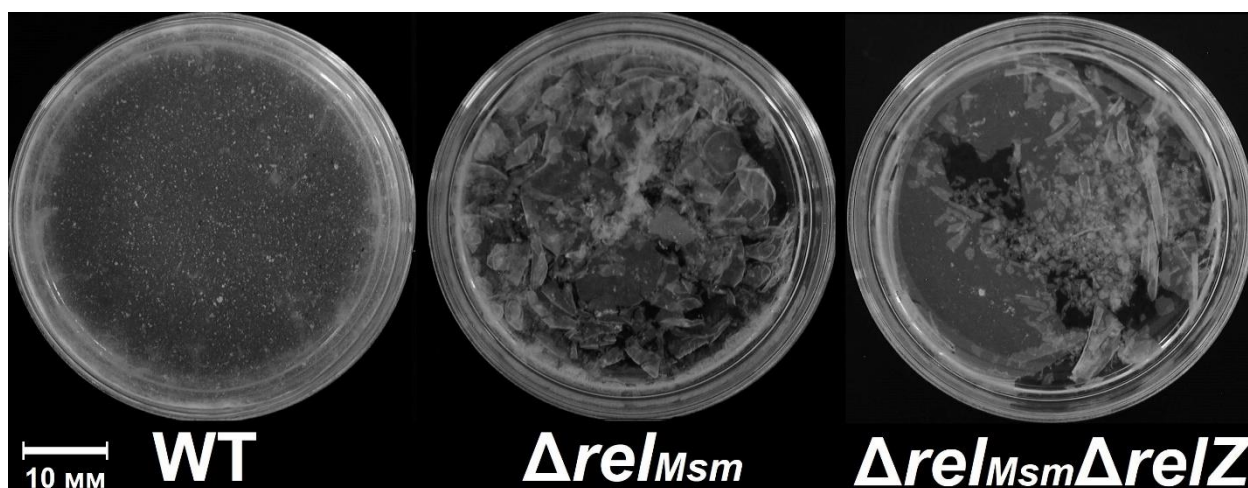


Рисунок 5 (фото). Поверхностные биоплёнки штаммов *M. smegmatis* mc² 155, выращенные в жидкой питательной среде в течение 72 часов.

Степень фрагментации биоплёнок возрастала пропорционально числу делеций. У штамма с одной делецией гена *rel_{Msm}* ещё можно увидеть довольно крупные фрагменты, осевшие на дно, в то время как у штамма с двойной делецией

генов *rel_{Msm}* и *relZ* осевшие на дно фрагменты настолько малы, что на фото выглядят как гомогенный слой. Таким образом, отсутствие алармонсинтетаз в клетках микобактерий приводит к нарушению биоплёнкообразования.

Проведённое сравнение биомасс поверхностной биоплёнки родительского штамма и фрагментов биоплёнок, осевших на дно чашки Петри, показало, что масса суммы фрагментов пелликулы у обоих штаммов-мутантов статистически не отличалась от массы биоплёнки родительского штамма (Рисунок 6).

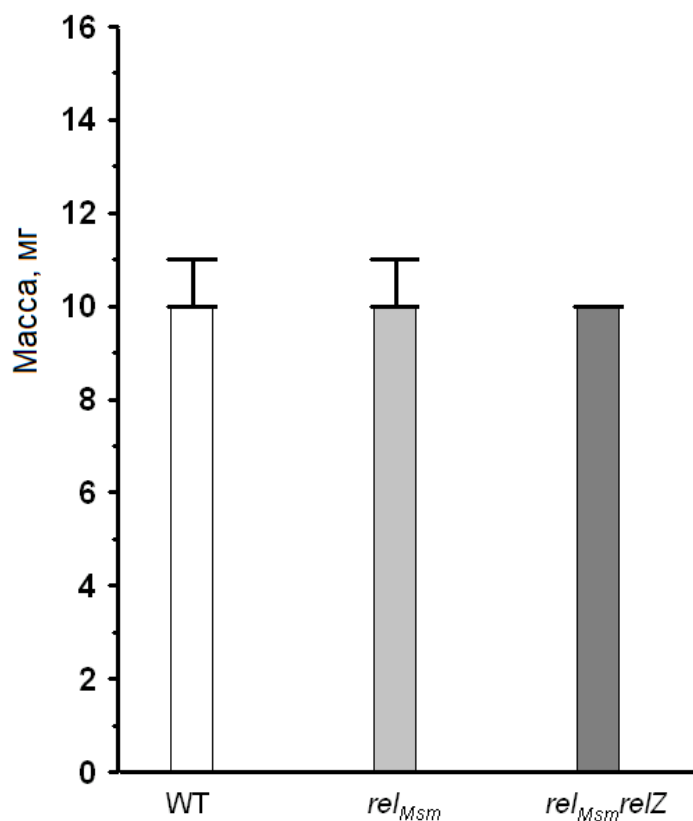


Рисунок 6. Биомасса биоплёнок штаммов микобактерий *M. smegmatis* mc² 155.

Отсутствие статистически значимых отличий между биомассой цельной биоплёнки (контрольный штамм дикого типа) и суммой фрагментов у штаммов-мутантов свидетельствует о том, что делеция алармонсинтетаз не влияет на выживаемость самих бактерий, и нарушение целостности поверхностной биоплёнки не связано с гибелью клеток.

Индукция сверхэкспрессионной плазмиды с геном *rel_{Msm}* или *relZ* в мутантном штамме восстанавливала способность формировать пелликулу. У

штамма с двойной делецией генов *rel_{Msm}* и *relZ* присутствие индуцированной плазмиды с одним из генов вызывало лишь частичное восстановление способности к биоплёнкообразованию, что выражалось в большей хрупкости биоплёнки: наличии разрывов и небольшом количестве фрагментов, осевших на дно (Рисунок 7).



Рисунок 7 (фото). Поверхностные биоплёнки штаммов *M. smegmatis* mc² 155, выращенные в жидкой питательной среде в течение 72 часов [Tkachenko *et al.*, 2021].

Поверхностная биоплёнка у штамма с делецией гена *rel_{Msm}* восстанавливалась независимо от того был ли в плазмиде индуцированный ген большой или малой алармонсинтетазы.

Таким образом, для успешного биоплёнкообразования микобактериям необходимы две функционирующие алармонсинтетазы, но для формирования целостной биоплёнки не обязательно функционирование обеих синтетаз, биоплёнка образуется и при экспрессии хотя бы одной из них.

3.1.2 Влияние активности генов алармонсинтетаз на скольжение микобактерий

Способность микобактерий быстро колонизировать поверхности за счёт скольжения представляет большой интерес, поскольку в качестве полужидкой поверхности, теоретически, могут выступать и внутренние ткани хозяина. Более того, скользящая колония подобно биоплёнке может служить средой для образования персистеров. Это связано с неравномерной скоростью движения бактерий внутри колонии: клетки на периферии движутся быстрее и располагаются менее плотно, тогда как в центре колонии монослой практически лишён свободных межклеточных пространств, что влияет на доступ к питательным веществам (Рисунок 8).

Работа алармонсинтетаз микобактерий, регулирующих уровни (p)ppGpp и полифосфатов, может влиять как на процессы роста и деления микобактерий (основной движущей силы скольжения), так и, предположительно, на свойства бактериальной поверхности и персистенцию. Исходя из этого, исследование влияния активности генов алармонсинтетаз на скольжение микобактерий позволит глубже понять данный механизм транслокации и оценить участие этих молекул в коллективных поведенческих реакциях.

Выращенные скользящие колонии (см. раздел 2.4 «Метод культивирования скользящих колоний *M. smegmatis*») предварительно были исследованы с помощью методов микроскопии. Это подтвердило наличие характерного монослоя клеток, свойственного процессу скольжения (Рисунок 8). Поскольку в используемом методе выращивания скользящих колоний мы изменили способ инокуляции, внося культуру бактерий не иглой [Martínez *et al.*, 1999], а микрокаплей (чтобы не повредить поверхность среды), дополнительно необходимо было оценить, как такой способ внесения влияет на стартовые условия скольжения. Необходимо было убедиться, что капля не растекается по поверхности, распространяя таким образом клетки подобно скольжению. Было проведено сравнение роста культуры на среде с субингибиторной концентрацией антибиотика и без него. Антибиотик значительно тормозил рост и препятствовал скольжению клеток за пределы зоны

внесения. Сравнение наглядно демонстрирует различия между колонией, в которой клетки могли скользить и колонией, где бактерии оставались только в области внесения жидкой культуры (Рисунок 9).

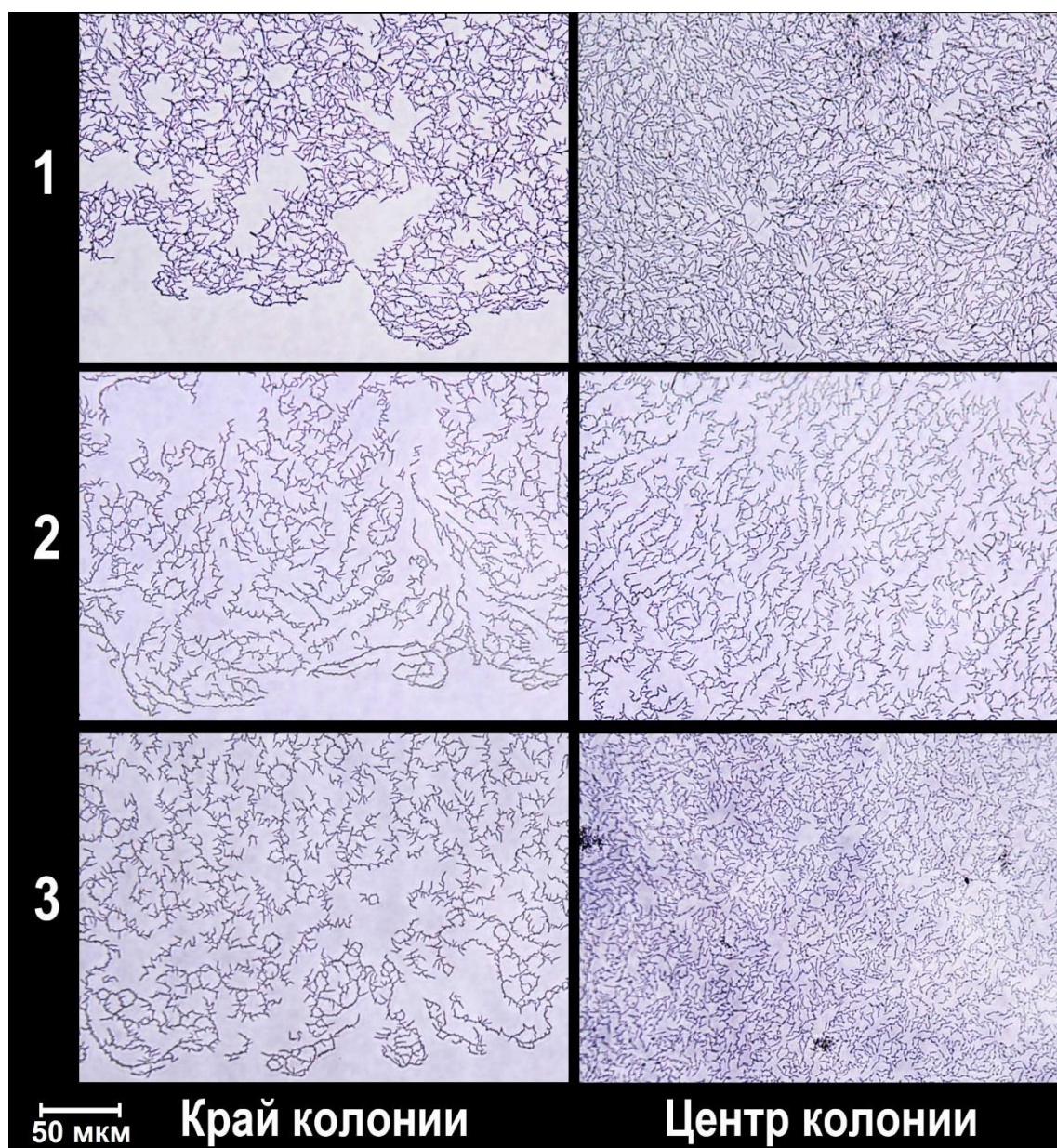


Рисунок 8 (фото). Плотность расположения клеток в центре и на краю скользящих колоний монослоя штаммов *M. smegmatis* mc² 155. 1 – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155, 2 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 с делецией гена Δrel_{Msm} , 3 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 с делециями генов $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$.

При сравнительном анализе скользящих колоний *M. smegmatis*, мы установили, что штамм с делецией rel_{Msm} образовывал колонию которая значительно превосходила по площади колонии двух других штаммов (Рисунок 9).

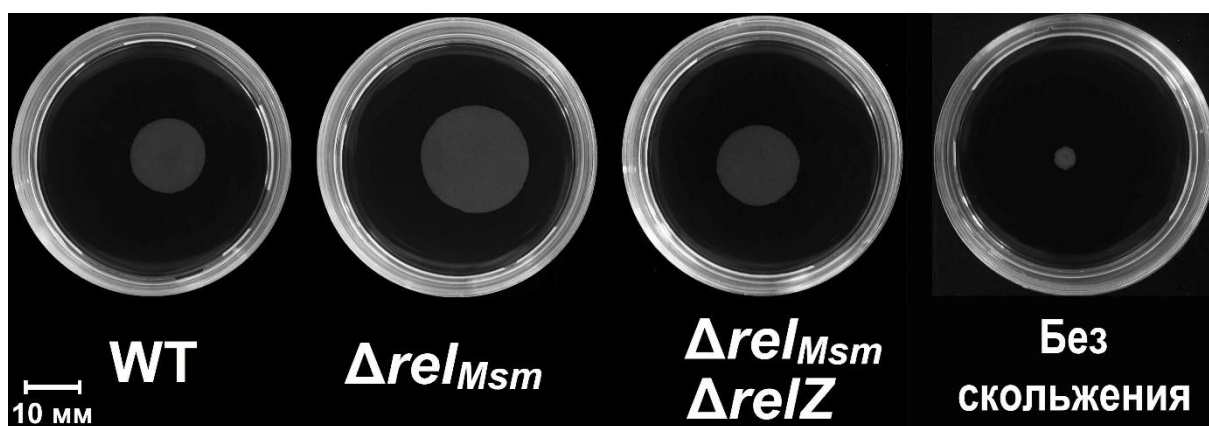


Рисунок 9 (фото). Скользящие колонии штаммов *M. smegmatis* mc² 155, выращенные на полужидкой среде в течение 16 часов. В качестве варианта «без скольжения» выращена колония штамма *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , выращенный на среде с добавлением 0,5 МПК стептомицина [Tsyganov, Tkachenko, 2022].

Площади колоний штамма с двойной делецией генов достоверно не отличались от родительского. В то же время площадь скользящих колоний штамма с делецией единственного гена rel_{Msm} превосходила по площади колонии двух других штаммов более чем в два раза (Рисунок 10).

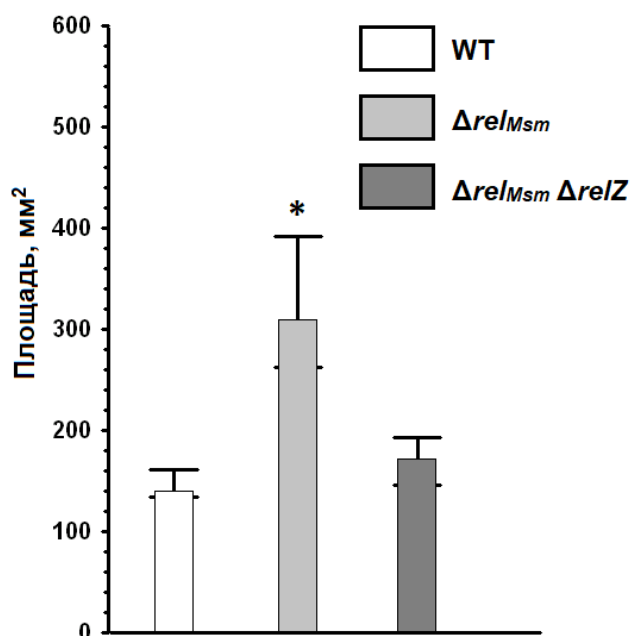


Рисунок 10. Площади скользящих колоний штаммов *M. smegmatis* mc² 155. * – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155 без делеций (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Помимо сравнения площадей скользящих колоний, мы исследовали скорость продвижения монослоя микобактерий по полужидкой поверхности после 12 часов от внесения культуры на поверхность полужидкой среды. Это позволило определить скорость скольжения колоний как у родительского штамма, так и у делеционных мутантов (Таблица 2).

Таблица 2. Скорости скольжения монослоя штаммов *M. smegmatis* (мкм/ч).

WT	Δrel_{Msm}	$\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$
$15,9 \pm 0,34$	$18,7 \pm 0,47$	$15,0 \pm 1,12$

WT – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, rel_{Msm} – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , $rel_{Msm}relZ$ – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$.

В таблице приведены средние скорости движения монослоя микобактерий, а также стандартное отклонение данных значений. Измерение скорости проводилось через 17 часов после внесения культуры на полужидкий агар.

Таким образом, делеция генов алармонсинтетаз оказывала разнонаправленное влияние на процесс скольжения. Отсутствие единственного гена rel_{Msm} , фермент которого осуществляет синтез и гидролиз ppGpp, приводило к росту площади скользящей колонии. Делеция генов обеих алармонсинтетаз уменьшала площадь скользящей колонии до размеров родительского штамма (Рисунки 9, 10).

3.1.4 Исследование влияния алармонсинтетаз на характер монослоя скользящих колоний *M. smegmatis*

С целью подтверждения участия алармонсинтетаз в процессе скольжения микобактерий, исследован характер формирования монослоя скользящих колоний у родительского штамма в сравнении с клетками штаммов с делецией одного (rel_{Msm}) или обоих генов, кодирующих алармонсинтетазы (rel_{Msm} и $relZ$). Поскольку использование метода окрашивания с этой целью затруднено, проведено наблюдение скольжения живых клеток с помощью метода фазового контраста. Этот подход позволил получить изображения неповреждённого монослоя,

отражающего реальную способность к скольжению, а также наблюдать процесс экспансивного распространения бактерий по поверхности в режиме реального времени (Рисунки 8, 11).

Исследование краев скользящих колоний микобактерий показало, что клетки делеционных мутантов располагаются менее плотно, чем у родительского штамма. При этом мутанты демонстрировали более высокую способность к скольжению, что выражалось более высокими значениями свободных площадей внутри колонии, не занятых клетками (Рисунок 11)

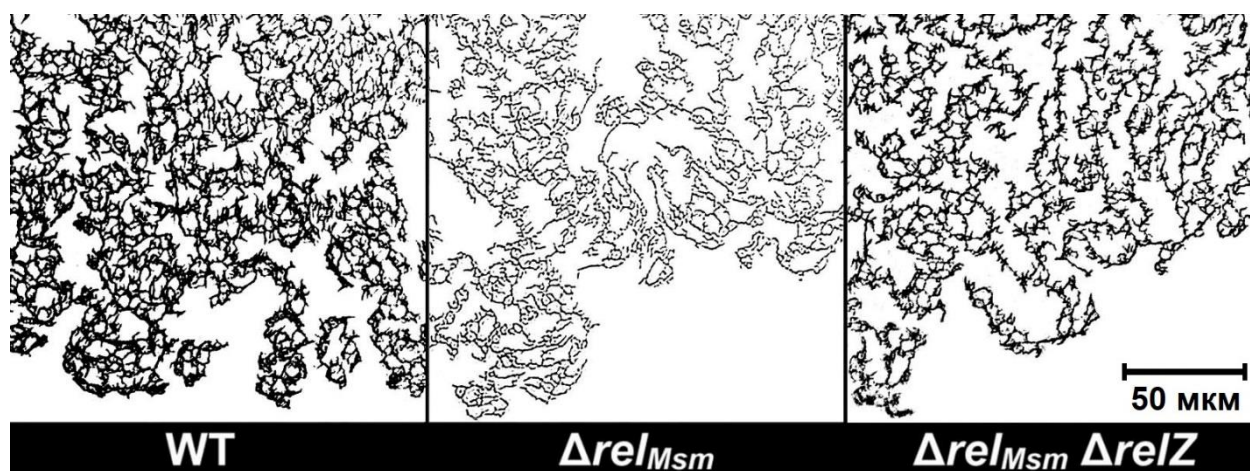


Рисунок 11. Фрагменты скользящих колоний штаммов *M. smegmatis* mc² 155. Участки края микрофотографии скользящих колоний обработаны в программе Adobe Photoshop для повышения контрастности (см. раздел 2.13 «Компьютерная обработка фотоснимков с целью количественной оценки способности *M. smegmatis* к скольжению в присутствии антибиотиков и полиаминов») [Tsyanov, Tkachenko, 2022].

Клетки штамма с делецией гена *relMsm* располагались на значительно большем расстоянии друг от друга, а разница в плотности клеток родительского штамма и штамма с двойной делецией генов алармонсинтетаз была менее выражена, что полностью согласуется с различиями в площадях скользящих колоний (Рисунки 8, 11).

Для количественной оценки плотности бактерий в колониях использован разработанный нами фотометрический метод обработки изображений монослоя (Рисунок 12). С целью точного выделения границ клеток и фона изображения предварительно обрабатывали для повышения контрастности (см. раздел 2.13

«Компьютерная обработка фотоснимков с целью количественной оценки способности *M. smegmatis* к скольжению в присутствии антибиотиков и полиаминов»). Анализ обработанных изображений позволил количественно оценить различия в соотношении межклеточного и занятого клетками пространства в монослоях скользящих колоний. Его значения прямо коррелировали с различиями в площадях. У мутантных штаммов клетки располагались дальше друг от друга, чем у родительского штамма микобактерий (Рисунок 13).

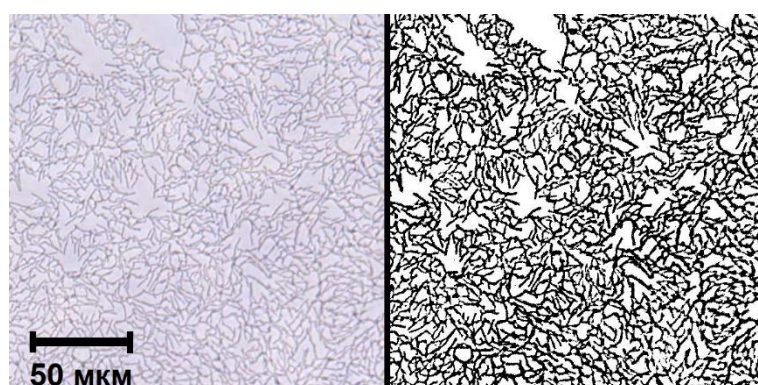


Рисунок 12. Измерение контрастности изображения монослоя колонии штамма *M. smegmatis* mc² 155 без делеций. **Слева** (фото) – фотография монослоя клеток, **справа** – результат обработки фотографии для исследования плотности расположения клеток.

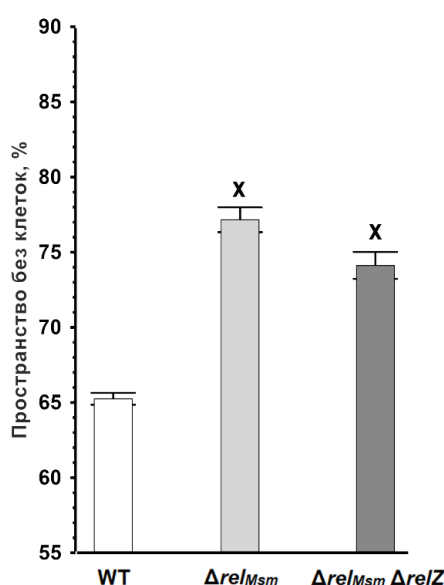


Рисунок 13. Сравнение плотности расположения бактерий в скользящих колониях штаммов *M. smegmatis* mc² 155. ^x – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155 без делеций (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Это подтверждает то, что изменения площадей колоний были обусловлены модуляцией процесса скольжения, а не изменения скорости пролиферации клеток. Таким образом, изменения в механизме скольжения микобактерий, вызванные делецией генов алармонсинтетаз, не связаны с их жизнеспособностью. Штамм с делецией гена большой алармонсинтетазы демонстрировал лучшую способность к скольжению и более широкое распространение по полужидкой поверхности, что подтверждается меньшей плотностью клеток и увеличенной площадью колонии.

Материалы раздела 3.1 опубликованы в работах:

Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tsyganov I.V., Vaganov V.Y., Shipilovskikh S.A., Rubtsov A.E., Malkov A.V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases // Cell chemical biology. – 2021. – № 28. – P. 1-13.

Nesterova L. Yu., Tsyganov I. V., Tkachenko A. G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2020. – V. 56. – № 4. P. – 387-394.

3.2 Оценка эффективности воздействия ингибитора персистенции DMNP на клетки *M. smegmatis* в условиях формирования биоплёнок и скольжения в сравнении с традиционными противотуберкулёзными антибиотиками

3.2.1 Сравнение эффективности традиционных антибиотиков и ингибитора персистенции клеток *M. smegmatis* в условиях формирования биоплёнок

Исследование эффективности действия антибиотиков на выживаемость бактерий в составе биоплёнок является актуальной задачей по трём основным причинам. Во-первых, биоплёнки представляют собой наиболее распространённую форму существования бактериальных сообществ в естественной среде. Во-вторых, бактерии в составе биоплёнок скрыты за слоем матрикса, что делает их менее восприимчивыми к воздействию неблагоприятных факторов среды, включая антибиотики. В-третьих, бактериальные биоплёнки являются благоприятной средой для формирования персистеров, что приводит к снижению эффективности антибактериальной терапии.

В исследовании использовались наиболее широко применяемые при терапии микобактериозов антибиотики: стрептомицин и рифампицин. Кроме того, изучалось влияние DMNP на биоплёнкообразование с целью сравнить его эффективность с традиционными препаратами.

Действие антибиотиков оценивали по таким показателям как минимальная бактерицидная концентрация (МБК) и минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование (МКПБ). МБК определяли как минимальную концентрацию антибиотика, при которой клетки теряли способность формировать пелликулы на поверхности жидкой среды и образовывать колонии при высевах из жидкой культуры на агаризованную среду. МКПБ определяли как минимальную концентрацию, при которой визуально отсутствовала поверхностная биоплёнка, хотя в жидкой среде оставались живые клетки микобактерий (см. раздел 2.5 «Определение чувствительности *M. smegmatis* к антибиотикам»).

Для корректного сравнения эффективности действия антибиотиков были определены их минимальные подавляющие концентрации (МПК) для свободно плавающих бактерий (Таблица 3). Это позволило адекватно сравнивать эффективность антибиотиков, различающихся по своим мишеням в клетках и механизмам действия. Поэтому при последующих сравнениях влияния антибиотиков на биоплёнкообразование и скольжение, а также минимальные бактерицидные концентрации (МБК) и минимальные концентрации, подавляющие биоплёнкообразование (МКПБ), будут выражены относительно МПК соответствующего антибиотика (Таблица 3).

Таблица 3. Минимальные подавляющие концентрации антибиотиков для свободноплавающих бактерий.

Антибиотик	Концентрация (мкг/мл)
DMNP	95
Рифампицин	4,8
Стрептомицин	0,12

При добавлении сублетальных концентраций DMNP в среду роста родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155, ингибирование роста биоплёнок наблюдалось при концентрации антибиотика DMNP 2,4 МПК. Концентрация DMNP 1,6 МПК приводила к росту фрагментированной, не прочной биоплёнки, сходной с таковой мутантных штаммов, растущих без антибиотиков.

Для бактерий мутантного штамма с одной делецией ингибирование роста биоплёнок происходило при концентрации DMNP 1,6 МПК, а двойного мутанта – 1,2 МПК (Рисунок 14). Также установлено, что в присутствии минимальных сублетальных концентраций антибиотика делеционные штаммы восстанавливали целостность своей поверхностной биоплёнки, что, вероятно, связано с адаптационными процессами к внешним стрессорам.

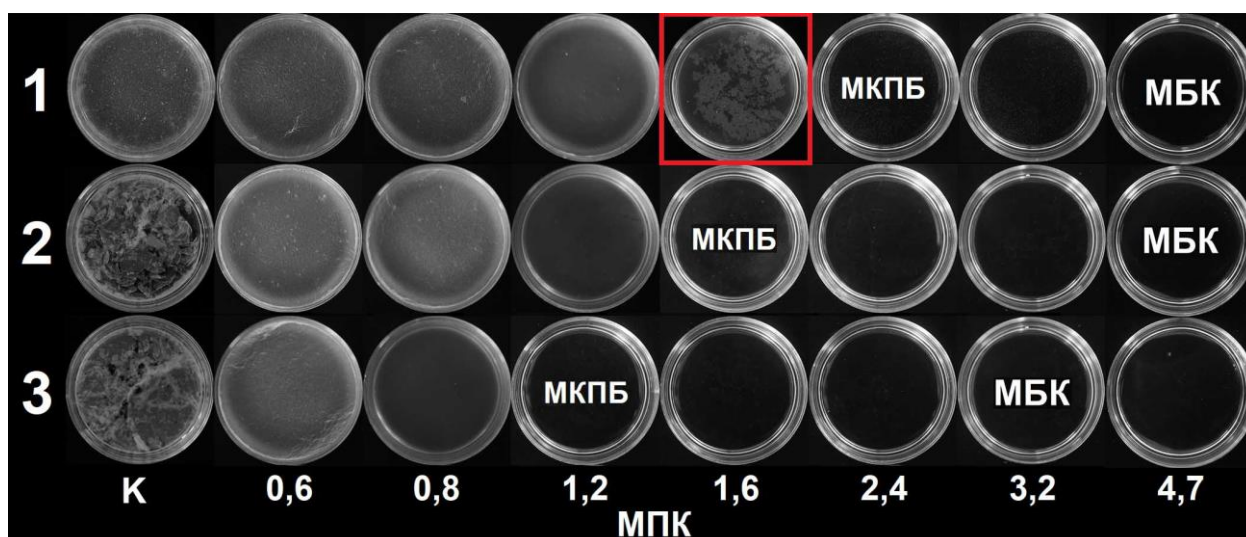


Рисунок 14. Чувствительность биоплёнок штаммов микобактерий к DMNP. 1 – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, 2 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , 3 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$, МПК – минимальная подавляющая концентрация, МБК – минимальная бактерицидная концентрация, МКПБ – минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование.

При исследовании фрагментов биоплёнки родительского штамма, подвергнутого воздействию сублетальной концентрации DMNP, с помощью метода атомно-силовой микроскопии (см. раздел 2.12 «Исследование клеточной поверхности микобактерий методом атомно-силовой микроскопии»), было выявлено, что поверхность бактерий претерпела изменения (Рисунок 15).

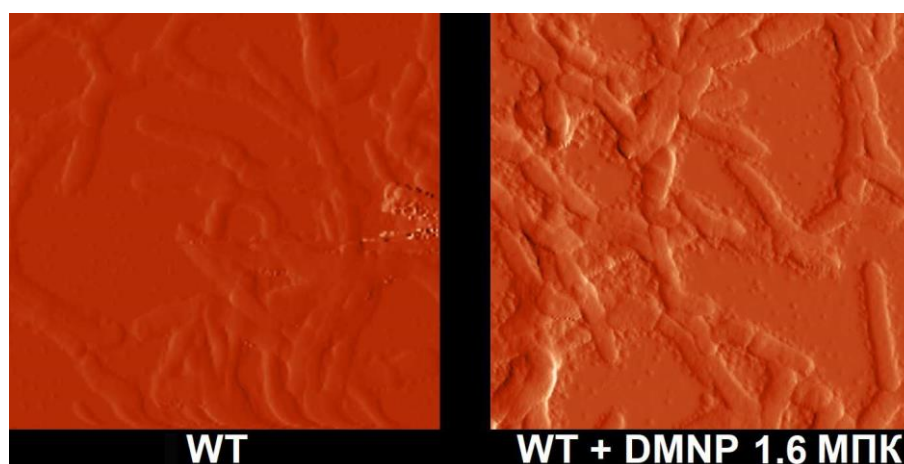


Рисунок 15. Бактерии *M. smegmatis* mc² 155 без делеций в биоплёнке и биоплёнка бактерий *M. smegmatis* mc² 155 в присутствии DMNP в концентрации, равной 1.6 МПК.

Измерения шероховатости поверхности клеток до и после воздействия антибиотика показали, что DMNP снижал шероховатость клеток более чем в два раза (Таблица 4). Поскольку DMNP нарушает работу алармонсинтетаз Rel_{Msm} и RelZ [Tkachenko *et al.*, 2021], сходный эффект наблюдается также в штаммах с делециями генов, кодирующих эти ферменты.

Таким образом, нарушение биоплёнкообразования с последующей фрагментацией биоплёнок может быть вызвано изменением свойств клеточной поверхности, а хрупкость и фрагментация биоплёнок бактерий *M. smegmatis* mc²155 с делециями генов, соответственно, обусловлены именно отсутствием алармонов.

Таблица 4 – Шероховатость поверхности (Sa) бактерий *M. smegmatis* mc²155 (WT) в составе биоплёнки

Штамм	Sa (± SE)
WT	13,1 ± 4,5
WT + DMNP 1.6 МПК*	6,4 ± 4,7

*Биоплёнка сформирована на питательной среде Middlebrook 7H9 с добавлением DMNP (1,6 МПК).

Чувствительность штаммов с делециями генов алармонсинтетаз и, соответственно, снижение в клетках продукта алармонсинтетаз – (p)ppGpp –

усиливало эффект DMNP, что выражалось в снижении минимальной концентрации, подавляющей образование поверхностных биоплёнок (МКПБ), и минимальной бактерицидной концентрации (МБК), при которой помимо биоплёнок отсутствовали и планктонные клетки (Таблица 5). Это может быть связано с тем, что алармонсинтетазы, включая те, которые ответственны за остаточный незначительный уровень алармонов, наблюдаемый в двойном нокауте *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$, являются не единственными мишенями для DMNP.

Таблица 5 – Минимальные концентрации DMNP подавляющие формирование биоплёнок (МКПБ) и планктонных клеток (МБК) у штаммов *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. Значения выражены в единицах МПК для каждого антибиотика.

	WT	Δrel_{Msm}	$\Delta rel \Delta relZ$
МКПБ	2,4	1,6	1,2
МБК	4,7	4,7	3,2

Значения сухой массы поверхностных биоплёнок делеционных штаммов в присутствии сублетальных концентраций DMNP были значительно меньше, чем биомасса пленок родительского штамма. Бактерии штамма *M. smegmatis* mc²155 с делециями обоих генов *rel_{Msm}* и *relZ* были наиболее чувствительны к антибиотику DMNP (Рисунок 16 А).

Если в штамме с делецией гена *rel_{Msm}*, индуцировали сверхэкспрессионную плазмиду с геном *rel_{Msm}* или *relZ*, его чувствительность к сублетальным концентрациям DMNP снижалась, вплоть до полного восстановления значений сухой биомассы поверхностных биоплёнок (Рисунок 16 В). При этом, экспрессия гена *rel_{Msm}* с плазмиды у штамма Δrel_{Msm} при некоторых концентрациях DMNP даже превосходила показатели родительского штамма. Биомасса биоплёнок бактерии штамма Δrel_{Msm} с плазмидой pMind::*relZ* статистически не отличалась от биомассы контроля. Таким образом, можно сделать вывод, что ген *rel_{Msm}* более эффективен по сравнению с *relZ*.

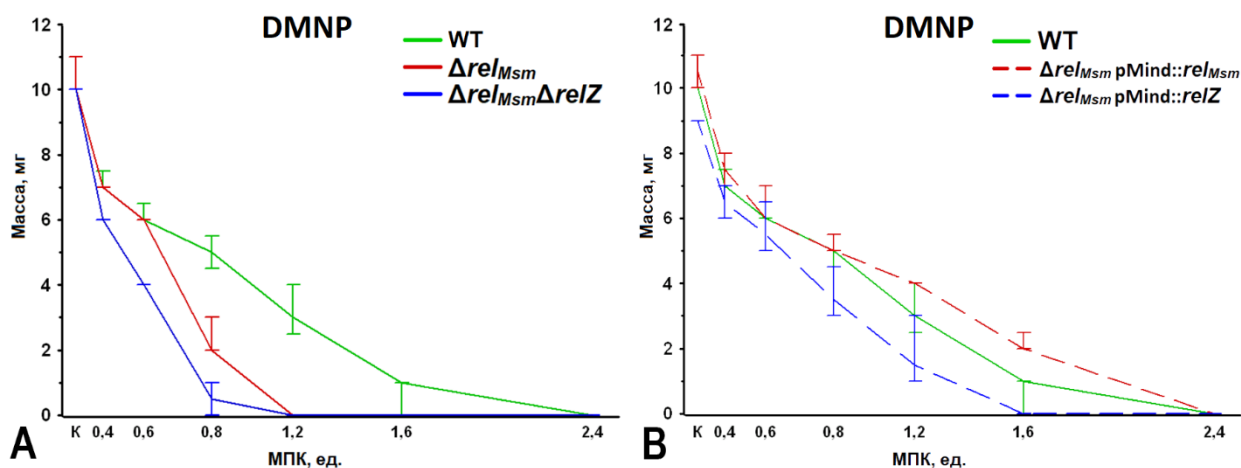


Рисунок 16. Влияние алармонсинтетаз Rel_{Msm} и $RelZ$ на чувствительность биоплёнок *M. smegmatis* mc²155 к DMNP. (А) – Изменение биомассы поверхностных биоплёнок *M. smegmatis* mc²155 в присутствии антибиотика DMNP. (В) – Изменение биомассы поверхностных биоплёнок бактерий *M. smegmatis* mc²155, содержащих сверхэкспрессионную плазмиду pMind со вставкой гена rel_{Msm} или $relZ$, в присутствии антибиотика DMNP.

Рифампицин – полусинтетическое производное природного рифамицина, синтезируемого бактерией *Amycolatopsis rifamycinica*. Его мишенью в бактериальной клетке является РНК-полимераза. Рифампицин специфически взаимодействует с самим ферментом [Wehrli *et al.*, 1968], а именно – с бета-субъединицей РНК-полимеразы [Rabussay, Zillig 1969], и ингибирует его работу на стадии инициации транскрипции, блокируя образование второй фосфодиэфирной связи, и, как следствие, дальнейшее удлинение цепи РНК [Johnston, McClure, 1976]. Несмотря на то, что это антибиотик широкого спектра действия, он наиболее эффективен против микобактерий и используется для терапии туберкулёза в комбинации с другими противотуберкулёзными препаратами.

В ходе исследования влияния рифампицина на биоплёнкообразование было обнаружено, что данный антибиотик был значительно менее эффективен, по сравнению с DMNP, в качестве ингибитора биоплёнкообразования (Рисунок 17).

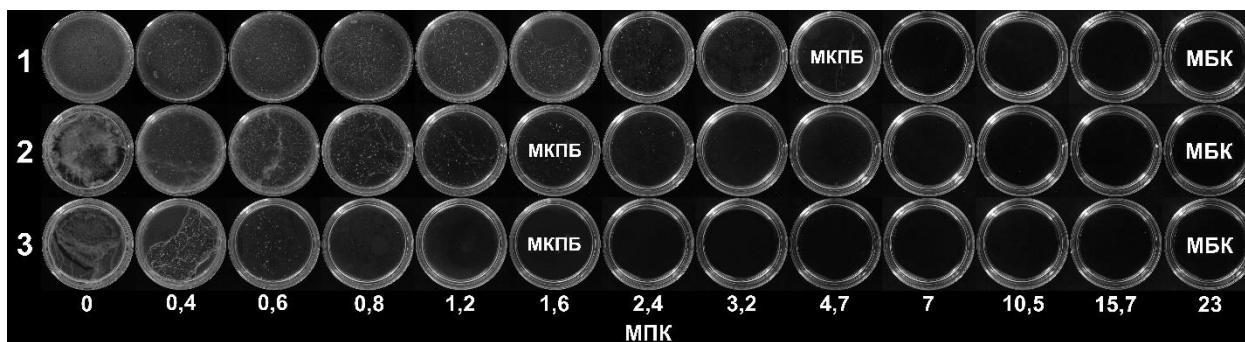


Рисунок 17. Формирование биоплёнок бактерий *M. smegmatis* mc² 155 в присутствии рифампицина. 1 – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, 2 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , 3 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$, МПК – минимальная подавляющая концентрация, МБК – минимальная бактерицидная концентрация, МКПБ – минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование.

Минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование, у рифампицина была эквивалентна минимальной бактерицидной концентрации DMNP для штамма без делеций. МКПБ рифампицина для делеционных штаммов была почти равна с МКПБ для DMNP, но МБК рифампицина была существенно больше, что свидетельствует о его более низкой эффективности против клеток, находившихся в стационарной фазе, а также клеток в составе биоплёнок (Таблица 6).

Таблица 6 – Минимальные концентрации рифампицина подавляющие формирование биоплёнок (МКПБ) и планктонных клеток (МБК) у штаммов *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. Значения выражены в единицах МПК для каждого антибиотика.

	WT	Δrel_{Msm}	$\Delta rel \Delta relZ$
МКПБ	4,7	1,6	1,6
МБК	23	23	23

Также было установлено, что процесс образования биоплёнок бактериями штаммов с делециями был более чувствителен к рифампицину по сравнению с бактериями родительского штамма. Значения МКПБ рифампицина для бактерий *M. smegmatis* mc² 155 с одинарной делецией rel_{Msm} и для бактерий с двойной делецией $rel_{Msm} relZ$ практически не отличались (Рисунок 18). МКПБ рифампицина для делеционных штаммов была почти равна с МКПБ DMNP, но МБК

рифампицина для тех же штаммов была в 5 раз выше, что свидетельствует о низкой эффективности рифампицина в отношении бактерий стационарной фазы, а также клеток в составе биоплёнок.

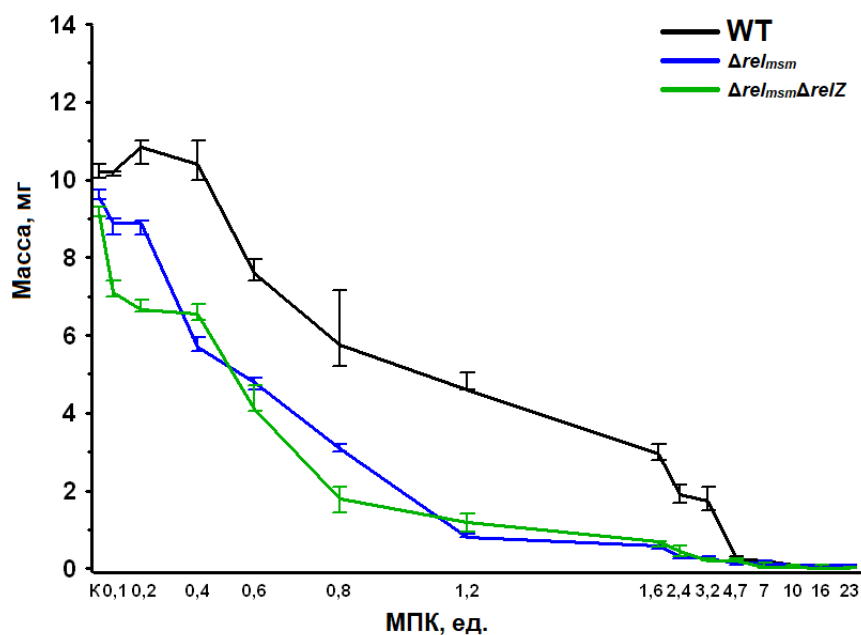


Рисунок 18. Влияние рифампицина на биомассу поверхностных биоплёнок бактерий *M. smegmatis* mc² 155.

Стрептомицин, как и рифампицин, активно применяется при лечении туберкулеза и микобактериозов, вызываемых нетуберкулёзными микобактериями. Мы исследовали его эффективность в отношении биоплёнок и его эффективность оказалась сопоставимой с эффективностью DMNP. Более того, показатели МКПБ и МБК стрептомицина были ниже для всех штаммов, по сравнению с DMNP (Рисунок 19).

Стрептомицин был первым из антибиотиков, проявивших эффективность против туберкулёза. Как известно, основной мишенью действия стрептомицина является бактериальная рибосома и связанный с ней синтез белка [Sharma *et al.*, 2007]. Кроме того, как показали результаты наших исследований, действие его сублетальных концентраций, как и в случае с DMNP (Рисунок 18) вызывало восстановление поверхностных биоплёнок у штаммов, делеционных по алармонсинотетазам, но при дальнейшем повышении концентрации антибиотика

их масса уменьшалась, а после достижения пороговой концентрации переставала формироваться (Рисунок 20).

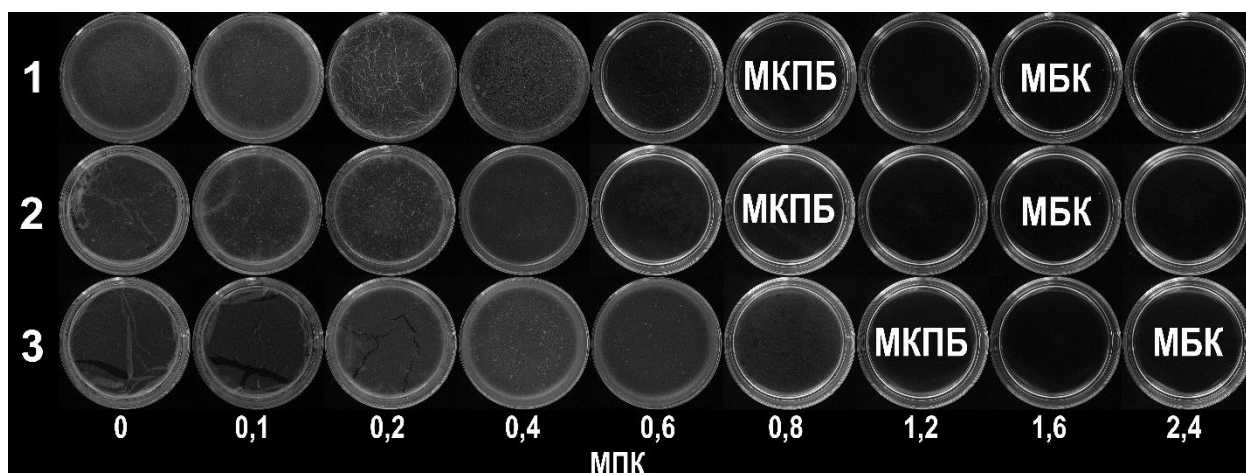


Рисунок 19. Формирование биоплёнок бактерий *M. smegmatis* mc² 155 в присутствии стрептомицина. 1 – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, 2 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , 3 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$, МПК – минимальная подавляющая концентрация, МБК – минимальная бактерицидная концентрация, МКПБ – минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование.

Реакция делеционных мутантов на воздействие сублетальных концентраций антибиотиков представляет собой пример гормезиса – адаптивного ответа бактерий на стресс, который проявляется в активации клеточного метаболизма, усилении процессов трансляции, репарации макромолекул и увеличении продукции алармона ppGpp [Mathieu et al., 2016]. Вероятно, в условиях горметического стрессового ответа у мутантных штаммов происходит восстановление внутриклеточных уровней ppGpp, необходимых для инициации процесса образования биоплёнок. В результате, при минимальных концентрациях антибиотиков и DMNP, происходит восстановление пелликул у мутантных штаммов. Данное наблюдение также может служить косвенным подтверждением существования дополнительных алармонсинтетаз, аналогичных Rel_{Msm} и $RelZ$.

Стрептомицин оказался единственным антибиотиком, который демонстрировал наименьшую эффективность против мутантных штаммов. Штамм с двойной делецией генов характеризовался наибольшими значениями масс биоплёнок при равных концентрациях АБ, а также наибольшими значениями

МКПБ и МБК. Такой результат, связанный с воздействием антибиотика, нарушающего синтез белка, на клетки с ослабленной адаптацией к стрессам, требует дальнейшего исследования.

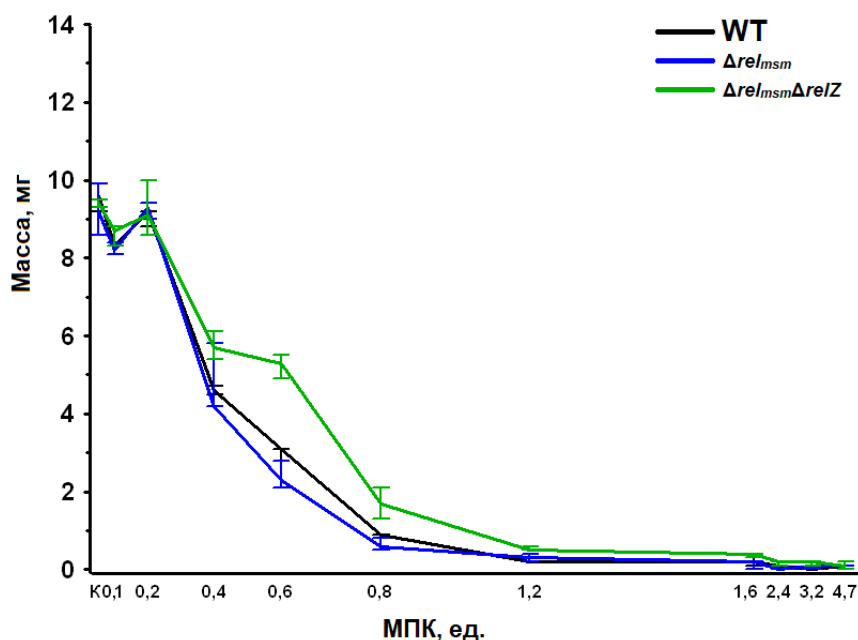


Рисунок 20. Влияние стрептомицина на биомассу поверхностных биоплёнок бактерий *M. smegmatis* mc² 155.

Примечательно также то, что для данного антибиотика незначительная разница между МКПБ и МБК (Таблица 7). Это считается отличительной характеристикой для оценки влияния антибиотиков на биоплёнкообразование [Garrison, Huigens Iii, 2017].

Таблица 7 – Минимальные концентрации стрептомицина, подавляющие формирование биоплёнок (МКПБ) и планктонных клеток (МБК) у штаммов *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. Значения выражены в единицах МПК для каждого антибиотика.

	WT	Δrel_{Msm}	$\Delta rel\Delta relZ$
МКПБ	0,8	0,8	1,2
МБК	1,6	1,6	2,4

Общепринятым считается критерий для оценки эффективности воздействия антибиотика на бактериальные клетки, согласно которому чем больше различия

между МКПБ и МБК, тем эффективнее антибиотик действует на клетки в составе биоплёнки, а не на их планктонные формы.

Тем не менее, несмотря на то, что стрептомицин показал худшее соотношение между этими концентрациями, он демонстрировал наилучшую антибактериальную эффективность за счет его способности в наименьших концентрациях подавлять биоплёнкообразование и вызывать гибель всех клеток, включая планктонные формы.

*3.2.2 Сравнение эффективности традиционных антибиотиков и ингибитора персистенции клеток *M. smegmatis* в условиях скольжения*

Поскольку микобактерии способны скользить по полужидким поверхностям, слизистая оболочка некоторых внутренних органов живых организмов может быть подходящей средой для их скольжения, включая патогенные виды, вызывающие микобактериозы [Zegadło, 2023].

Скользящая колония имеет свои характерные особенности, которые отличают её как от биоплёночных сообществ, так и от колоний свободноживущих бактерий в жидкой среде. Край скользящей колонии состоит из монослоя бактерий, сравнительно неплотно расположенных относительно друг друга и перемещающихся под воздействием давления делящихся клеток по поверхности среды от центра колонии к её периферии. В центре колонии бактерии формируют более плотный монослой, почти лишённый подвижности. (Рисунок 8) Эти клетки, вероятно, испытывают дефицит питательных веществ, что сближает эту область скользящей колонии с биоплёнками и создаёт оптимальные условия для перехода бактерий в стационарную фазу и состояние персистенции.

Исследование эффективности антибиотиков в отношении скользящих сообществ микобактерий является перспективным с точки зрения определения наиболее эффективных соединений, создающих помехи для их распространения в организме хозяина, то есть инвазивности бактерий, в ряду традиционных антибиотиков в сравнении с ингибитором персистенции DMNP, эффективным против клеток в процессе их перехода в стационарную фазу.

Для изучения воздействия антибиотиков на процесс скольжения были подобраны их сублетальные концентрации (см. раздел 2.5 «Определение чувствительности *M. smegmatis* к антибиотикам»), которые постепенно снижали площадь скользящих колоний, облегчая оценку их способности подавлять процесс скольжения (см. раздел 2.13 «Компьютерная обработка фотоснимков с целью количественной оценки способности *M. smegmatis* к скольжению в присутствии антибиотиков и полиаминов»). Концентрации выражены в относительных значениях МПК, что позволяет сравнивать действие препаратов. Также, мы исследовали возможное влияние метанола на скольжение. Это связано с тем, что в нём был растворён DMNP, а также с тем, что процесс скольжения, в отличие от биоплёнокообразования, гораздо более чувствителен к факторам внешней среды. Объём метанола, который вносили в среду, был равен 50 мкл на 5 мл агаризованной среды, что было больше, чем количество метанола в любой чашке, где присутствовала смесь DMNP и метанола. Данное количество метанола статистически значимо не уменьшало площадь скользящих колоний штаммов, таким образом, не ограничивая скольжение.

Наиболее эффективным в отношении штамма *M. smegmatis* mc² 155 оказался рифампицин – антибиотик, ранее показавший наименьшую эффективность против биоплёнок микобактерий. Его концентрации, приводившие к значительному уменьшению площади скользящих колоний, оказались значительно ниже, чем у других антибиотиков. Стрептомицин и DMNP проявляли меньшую эффективность, но демонстрировали сходную между собой активность при сопоставимых концентрациях (Рисунок 21). Тем не менее, при более детальном сравнении влияния на скольжение стрептомицина и DMNP можно заметить отличия. Минимальные концентрации DMNP приводили к уменьшению площади скользящих колоний на 40-50%, в то время как остальные антибиотики наоборот, были менее эффективны при минимальных концентрациях, но после определённого порога вызывали резкое сокращение площадей скользящих колоний. Аналогичные результаты получены при изучении влияния антибиотиков на скольжение штамма с делецией гена Δrel_{Msm} . Рифампицин был кратно более

эффективен, остальные соединения демонстрировали схожие показатели эффективности (Рисунок 22).

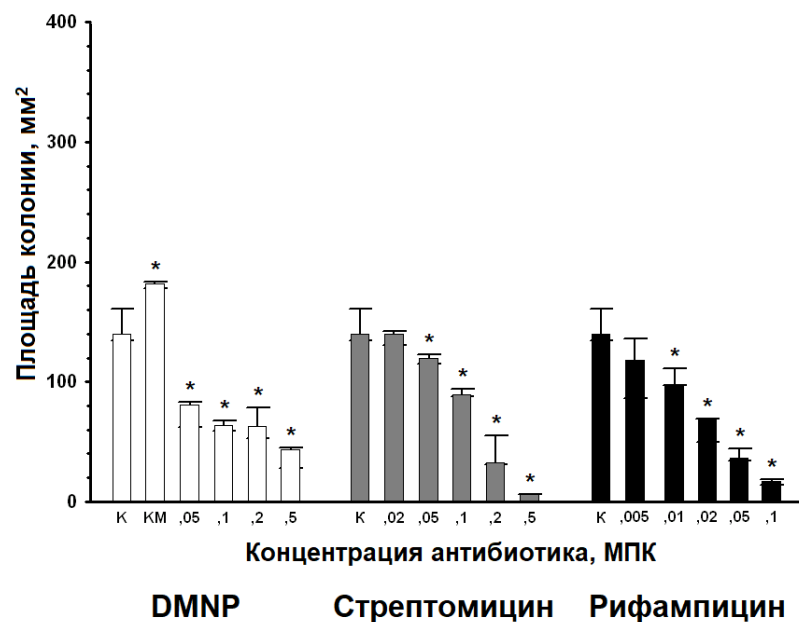


Рисунок 21. Влияние противомикобактериальных антибиотиков и DMNP на скольжение штамма *M. smegmatis* mc² 155. К – контроль без добавления антибиотика, KM – контроль без антибиотика, но с добавлением 50 мкл метанола. * – Статистически значимое отличие от контроля без добавления антибиотика (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$)

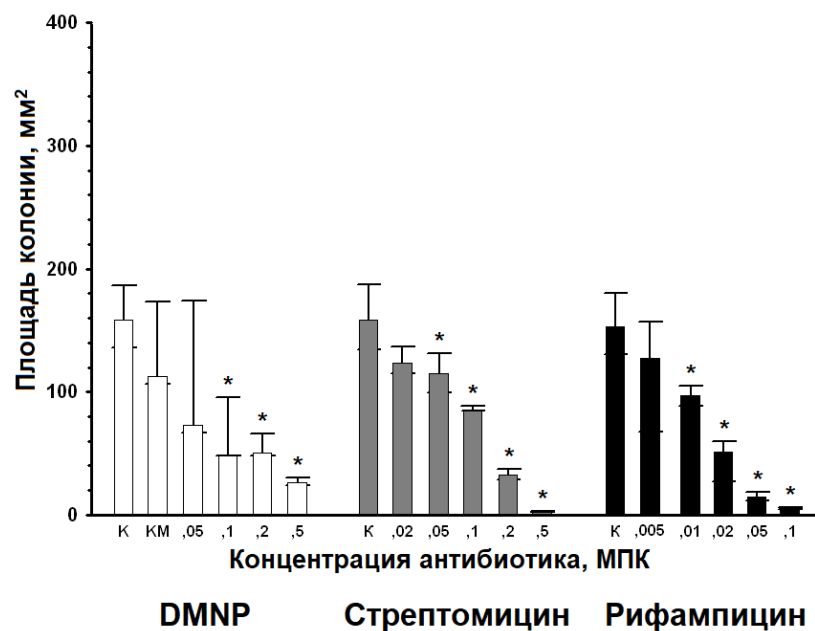


Рисунок 22. Влияние противомикобактериальных антибиотиков и DMNP на скольжение штамма *M. smegmatis* mc² 155 ΔrelMsm. К – контроль без добавления антибиотика, KM – контроль без антибиотика, но с добавлением 50 мкл метанола. * – Статистически значимое отличие от контроля без добавления антибиотика (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$)

Картина скольжения у штамма *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} $\Delta relZ$ в присутствии антибиотиков была аналогична штамму с делецией одного гена Δrel_{Msm} . Стрептомицин, практически не влияя на площадь колонии при минимальных концентрациях, резко снижал её размеры начиная с 0,01 МПК. Рифампицин снова проявил наибольшую эффективность, DMNP при минимальных концентрациях эффективнее снижал площадь колоний, а при максимальных концентрациях наоборот – уменьшал площадь скольжения значительно меньше, чем стрептомицин (Рисунок 23).

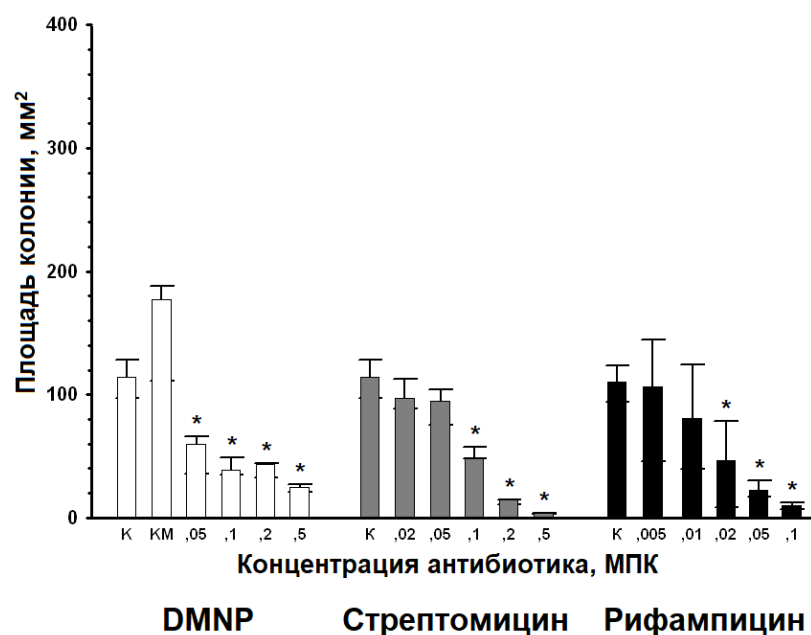


Рисунок 23. Влияние противомикобактериальных антибиотиков и DMNP на скольжение штамма *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} $\Delta relZ$. К – контроль без добавления антибиотика, KM – контроль без антибиотика, но с добавлением 50 мкл метанола. * – Статистически значимое отличие от контроля без добавления антибиотика (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$)

Традиционные противомикобактериальные антибиотики лучше справлялись с уменьшением площади скользящих колоний при относительно высоких концентрациях (0,005 МПК для рифампицина и 0,05 для стрептомицина). При этом площадь колоний во всех случаях снижалась до уровня, близкого к площади первоначальной точки внесения бактериальной культуры (Рисунки 21-23). отличие от них, DMNP уже при минимальных концентрациях вызывал заметное уменьшение площади, но дальнейшее увеличение концентрации приводило к

меньшим изменениям (Рисунок 21). Штамм с делециями генов был более чувствителен к DMNP (Рисунок 23).

Подобное различие в действиях антибиотиков можно объяснить их механизмами влияния на бактерии. Традиционные препараты не влияют непосредственно на процесс скольжения, но их бактерицидный эффект при достижении пороговой концентрации уничтожает бактерии в колонии. Напротив, DMNP подавляет скольжение или убивает немногочисленные персистеры, но обладает более слабым бактерицидным эффектом в отношении микобактерий в экспоненциальной фазе.

Для точной оценки влияния антибиотиков на процесс скольжения использовали концентрации, которые не снижали жизнеспособность бактерий. Оценка количества КОЕ/мл в жидкой среде Middlebrook 7H9 (см. раздел 2.5 «Определение чувствительности *M. smegmatis* к антибиотикам») показала, что концентрации DMNP и стрептомицина до 0,1 МПК включительно и рифампицина до 0,02 МПК включительно не уменьшали жизнеспособность исследованных штаммов. Это позволило исследовать влияние соединений исключительно на ограничение скольжения, не затрагивая бактерицидный эффект.

Все исследованные антибиотики при минимальных концентрациях ограничивали процесс скольжения, не влияя на выживаемость клеток. Однако эффективность ограничения скольжения была разной и зависела от активности генов алармонсинтетаз (Рисунок 24). Стрептомицин продемонстрировал наименьшую эффективность в ограничении скольжения, тогда как DMNP оказался наиболее эффективным.

Таким образом, наиболее эффективным антибиотиком в отношении скользящих колоний микобактерий оказался рифампицин, так как он обладал минимальной концентрацией, ограничивающей скольжение (Рисунок 24), и минимальной концентрацией, приводящей к гибели клеток (Рисунки 21-23), и минимальной концентрацией, ограничивающей скольжение без бактерицидного эффекта (Рисунок 24С). Остальные антибиотики демонстрировали схожие результаты одного порядка, но DMNP не вызывал гибели клеток скользящей

колонии, и его основной эффект обусловлен ограничением скольжения. По мере возрастания числа делеций эффективность ограничения скольжения DMNP усиливалась по сравнению со стрептомицином.

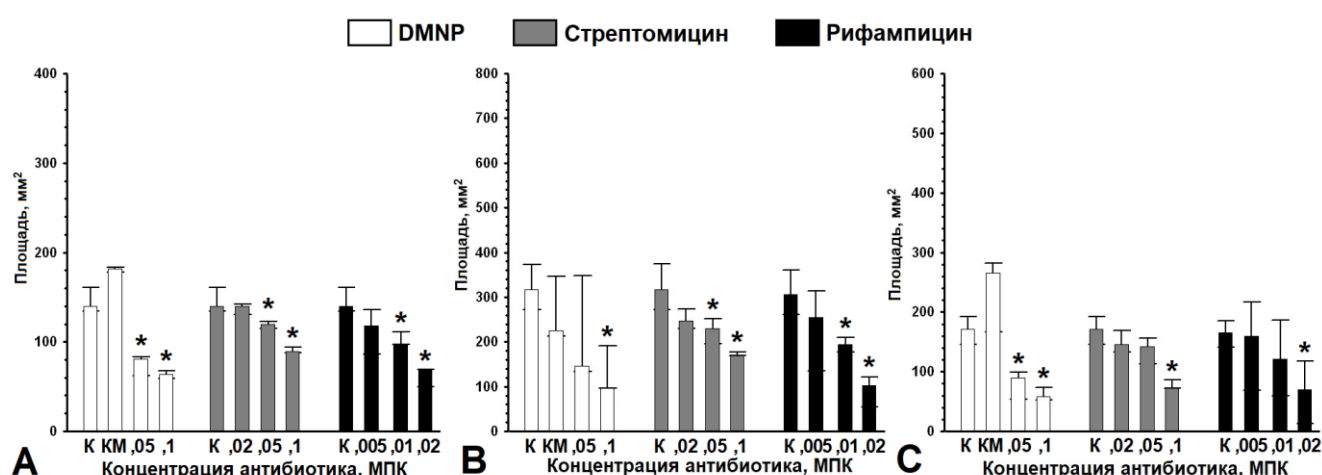


Рисунок 24. Ограничение скольжения антибиотиками и DMNP штаммов *M. smegmatis* mc² 155. (А) Штамм *M. smegmatis* mc² 155, (В) Штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , (С) Штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta rel_Z$. К – контроль без добавления антибиотика, КМ – контроль без антибиотика, но с добавлением 50 мкл метанола.

Материалы раздела 3.2 опубликованы в работе:

Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tsyganov I.V., Vaganov V.Y., Shipilovskikh S.A., Rubtsov A.E., Malkov A.V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases // Cell chemical biology. – 2021. – № 28. – P. 1-13.

3.3 Изучение роли гликопептидолипидов и полифосфатов в формировании биоплёнок и скольжения микобактериальных клеток

3.3.1 Роль гликопептидолипидов в скольжении и формировании биоплёнок *M. smegmatis*

Гликопептидолипиды (ГПЛ) являются характерным компонентом клеточной оболочки микобактерий и, согласно существующей модели процесса скольжения [Recht *et al.*, 2000], играют ключевую роль в формировании гидрофобной поверхности.

Для изучения роли ГПЛ в процессах скольжения и биоплёнкообразования *M. smegmatis*, а также с целью исследования связи между этими процессами и активностью алармонсинтетаз, нами проведён сравнительный анализ количества ГПЛ у штаммов без делеций и с делециями генов алармонсинтетаз. Полученные данные были сопоставлены с результатами экспериментов по биоплёнкообразованию и скольжению указанных штаммов.

Исследование содержания ГПЛ в клеточных стенках микобактерий (см. раздел 2.10 «Определение содержания гликопептидолипидов в штаммах *M. smegmatis*») показало, что уровень ГПЛ у штамма дикого типа был значительно выше, чем у штаммов, мутантных по алармонсинтетазе. При этом возрастание числа делеций приводило к уменьшению содержания гликопептидолипидов в бактериальных клетках (Рисунок 25).

Профиль ГПЛ у штамма с делецией гена *rel_{Msm}* был на 40% менее заметен профиля у родительского штамма. Делеция обеих алармонсинтетаз вызывала более, чем двукратное снижение уровня ГПЛ в клеточной оболочке.

Прямая зависимость между активностью алармонсинтетаз и содержанием ГПЛ полностью соответствует результатам, полученным ранее при исследовании биоплёнкообразования (см. раздел 3.1.1 «Влияние активности генов алармонсинтетаз на биоплёнкообразование микобактерий»). Можно предположить, что гидрофобность бактериальной поверхности, обусловленная высоким содержанием ГПЛ, вероятно, играет ключевую роль в способности микобактерий формировать устойчивые биоплёнки на поверхности жидкостей. Дефицит ГПЛ снижает гидрофобность, что приводит к разрушению биоплёнок и к оседанию фрагментов на дно (Рисунки 5, 7). Таким образом, алармонсинтетазы микобактерий, активность которых наиболее высока в стационарной фазе роста, усиливают биоплёнкообразование благодаря модуляции уровней ГПЛ в клеточной оболочке.

Вместе с тем, полученные нами результаты сравнительного анализа содержания ГПЛ не согласуются с ранее опубликованными данными о скольжении

штаммов *M. smegmatis*, в том числе представляющими модель скольжения [Recht *et al.*, 2000].

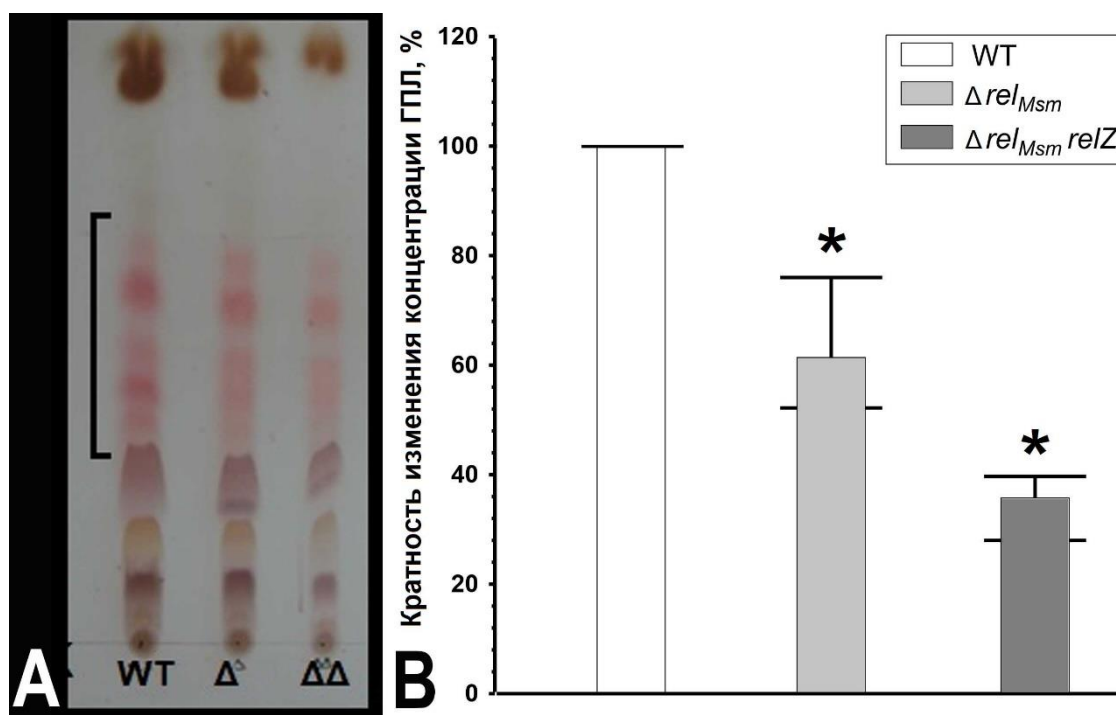


Рисунок 25. Спектры ГПЛ экстрагированных из бактерий *M. smegmatis* mc² 155. (А) (фото) Хроматограмма спектра ГПЛ экстрагированных из бактерий *M. smegmatis* mc² 155. (В) Сравнение интенсивности яркости пятен ГПЛ относительно родительского штамма без делеций генов. * – Статистически значимое отличие от контрольного штамма *M. smegmatis* mc² 155 без делеций (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$) [Tsyganov, Tkachenko, 2022].

Согласно представленной модели, содержание ГПЛ в клеточной стенке должно быть прямо пропорционально способности бактерий скользить по полужидким поверхностям. Однако в наших экспериментах бактерии штамма с делецией гена *rel_{Msm}*, несмотря на снижение уровня ГПЛ, демонстрировали более выраженную способность к скольжению (Рисунки 9, 10), формируя монослой с менее плотным расположением бактерий (Рисунки 8, 13). В то же время штамм с двойной делецией генов *rel_{Msm}* и *relZ*, несмотря на ещё более низкий уровень ГПЛ, не уступал в скольжении родительскому штамму, но его скольжение достоверно снижалось относительно уровня, наблюдаемого у мутанта с однократной делецией *rel_{Msm}*.

Изучению скольжения микобактерий посвящено достаточно мало исследований, тем не менее, на данный момент сформировалось консенсусное мнение, что наличие ГПЛ необходимо для скольжения по гидрофильным поверхностям. В то же время нельзя утверждать, что связь между ГПЛ и скольжением является жестко коррелирующей. Например, в недавнем исследовании изменения морфотипа *M. abscessus* усиление скольжения и формирование более гладкой поверхности колонии не сопровождалось увеличением содержания ГПЛ в клеточной оболочке [Liu *et al.*, 2021]. Полученные результаты поддаются объяснению, если учесть, что клеточная стенка микобактерий богата и другими липидами, которые, вероятно, также могут существенно повлиять на процесс скольжения. Не исключено, что, наряду с изменением уровня ГПЛ, нокауты по алармонсинтетазам дают дополнительный, до сих пор неучтенный эффект на другие системы бактериальной клетки, приводящие в конечном итоге к изменению скольжения. Таким образом, данная проблема требует дальнейших исследований.

3.3.2 Роль полифосфатов в скольжении и формировании биоплёнок *M. smegmatis*

Поскольку для исследования уровней полифосфатов использован метод флуоресцентной детекции комплекса DAPI-полифосфат (см. раздел 1.4.2 «Участие алармонсинтетаз в регуляции внутриклеточных концентраций полифосфатов»), перед началом экспериментов необходимо было убедиться, что DAPI не образует флуоресцирующих комплексов с внутриклеточными монофосфатами. Несмотря на то, что в публикациях, где описан метод измерения полифосфатов с помощью DAPI, указано, что данный реактив не образует комплексов с монофосфатами [Diaz, Ingall, 2010], была проведена дополнительная проверка измерения флуоресценции проб, в которых содержались гидролизованные полифосфаты и DAPI.

Для проверки использовали образцы полифосфатов родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155, которые разделили на две части. Одну часть смешивали с

DAPI и измеряли флуоресценцию, а другую предварительно подвергали гидролизу в 10Н HCl при температуре 105°C. После гидролиза пробы смешивали с DAPI и измеряли флуоресценцию. В качестве отрицательного контроля использовали физиологический раствор без добавления DAPI.

Результаты измерений флуоресценции (см. раздел 2.9 «Количественная оценка содержания полифосфатов в клетках *M. smegmatis*») подтвердили, что после гидролиза в пробах оставались только монофосфаты, которые не взаимодействовали с DAPI и не флуоресцировали. Минимальные значения флуоресценции не превышали уровни флуоресценции проб без DAPI. Эти значения вычитались из всех последующих измерений флуоресценции (Рисунок 26).

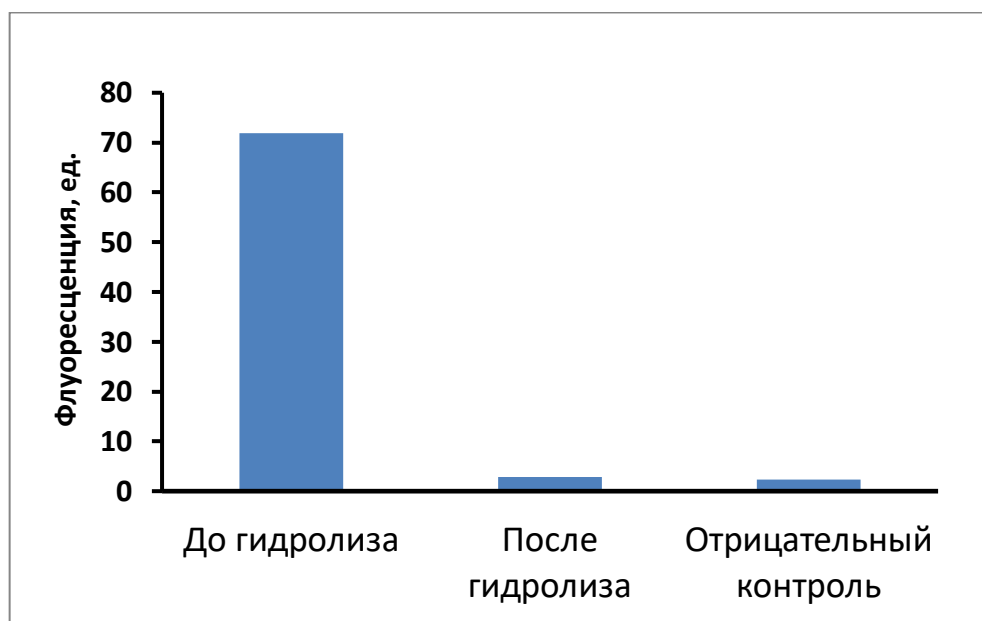


Рисунок 26. Сравнение флуоресценции комплексов полифосфат-DAPI с флуоресценцией проб монофосфатов и проб, не содержащих фосфаты. «До гидролиза» – проба, содержащая полифосфаты, выделенные из штамма *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, «После гидролиза» – проба, содержащая полифосфаты, выделенные из штамма *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, которые перед измерением подверглись гидролизу до монофосфатов, «Отрицательный контроль» – проба, не содержащая полифосфаты.

Таким образом, при последующих измерениях полифосфатов с помощью DAPI все полученные данные отражали исключительно флуоресценцию полифосфатов, не искажаемую присутствием монофосфатов.

Для изучения влияния изменения уровней полифосфатов в клетках микобактерий на процессы биоплёнкообразования и скольжения была исследована

динамика изменения концентраций полифосфатов в штамме без делеций генов алармонсинтетаз, а также в мутантных штаммах с делецией одной или двух алармонсинтетаз – rel_{Msm} и $relZ$. Полученные результаты сравнивали с характеристиками биоплёнкообразования и скольжения этих штаммов в те же временные промежутки.

Алармоны (p)ppGpp выполняют одну из ключевых функций регуляции стринджен-ответа, подавляя активность экзополифосфатаз, которые гидролизуют полифосфаты (см. раздел 2.5 «Определение чувствительности *M. smegmatis* к антибиотикам») [Mathew *et al.*, 2004]. Можно предположить, что последовательное устранение регуляции экзополифосфатаз через делеции генов алармонсинтетаз должно приводить к снижению внутриклеточных концентраций полифосфатов и снижению адаптивных возможностей микобактерий к стрессу. Тем не менее, регуляция активности экзополифосфатаз является гораздо более сложным процессом, чем изначально может показаться. Например, «большая» алармонсинтетаза Rel_{Msm} осуществляет не только синтез, но и гидролиз (p)ppGpp, поэтому её делеция может приводить к неоднозначным результатам.

Результаты измерения уровней полифосфатов показали, что бактерии штамма с делецией гена, кодирующего «большую» алармон синтетазу rel_{Msm} , содержали значительно более высокие уровни полифосфатов относительно бактерий родительского штамма. Такие различия в содержании полифосфатов сохранялась на протяжении всей стационарной фазы и наблюдались также в фазе отмирания клеток после 72 часов культивирования. Микобактерии штамма с двойной делецией генов rel_{Msm} и $relZ$, напротив, содержали более низкое количество полифосфатов на всех этапах развития бактериальной культуры (Рисунок 27).

Возрастание концентрации полифосфатов на мг сухой биомассы, наблюдаемое у бактерий штамма Δrel_{Msm} , вероятно, обусловлено двойной функцией кодируемой данным геном алармонсинтетазы. Поскольку rel_{Msm} участвует как в синтезе, так и в гидролизе (p)ppGpp, увеличение уровня полифосфатов может быть связано со снижением концентрации алармона в клетках микобактерий. Таким образом, можно сделать вывод, что функция гидролиза rel_{Msm}

у преобладает над синтезом, а делеция гена, кодирующего rel_{Msm} , приводит к возрастанию внутриклеточной концентрации полифосфата. В случае же двойной делеции генов rel_{Msm} и $relZ$, снижение способности к регуляции активности экзополифосфатаз через недостаток (p)ppGpp закономерно приводило к снижению уровня полифосфатов.

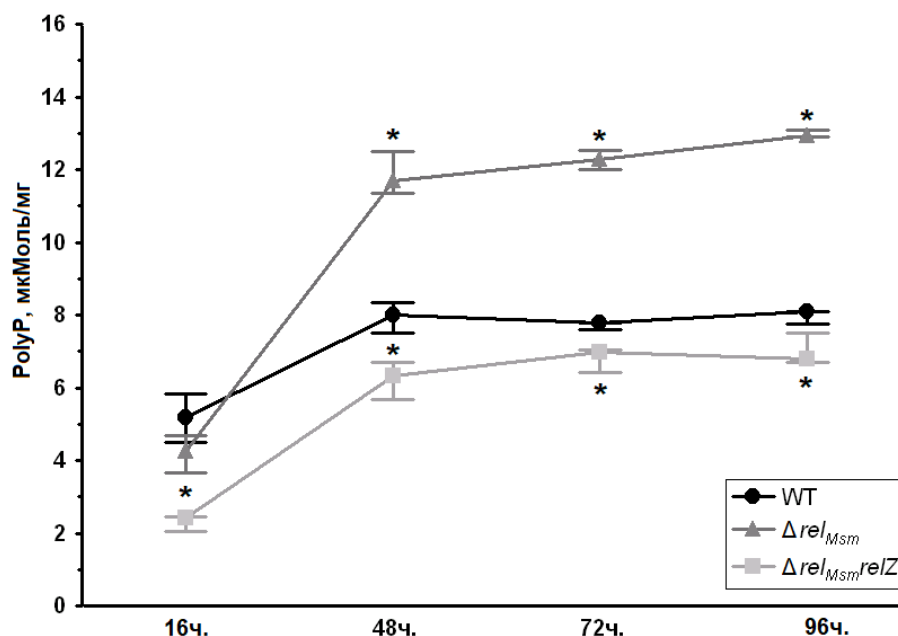


Рисунок 27. Влияние алармонсинтераз на уровни полифосфатов в клетках штаммов *M. smegmatis* mc² 155. * – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155 (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Примечательно, что различия в уровнях полифосфатов между штаммами частично соответствовали показателям их способности к скольжению. Коэффициент корреляции Пирсона между площадями скользящих колоний и уровнями полифосфатов составил 0,75, что указывает на сильную связь между этими показателями. Штамм с делецией rel_{Msm} демонстрировал наибольшую способность к скольжению по полужидкой среде, и в то же время его уровень полифосфатов значительно превосходил показатели других исследованных штаммов.

Полифосфаты могут быть секретированы во внешнюю среду и восприниматься другими бактериями, выступая сигнальными молекулами. Возможно, у микобактерий они играют роль в координации процесса скольжения.

Однако, несмотря на полученные данные, корреляция между внутриклеточными уровнями полифосфатов и способностью микобактерий к биоплёнкообразованию не была обнаружена. Несмотря на то, что существуют исследования других микроорганизмов, указывающие на положительную зависимость между содержанием полифосфатов и образованием биоплёнок [Shi *et al.*, 2004; Grillo-Puertas *et al.*, 2012], у микобактерий эта связь проявляется слабо. Вероятно, изменения в составе клеточной оболочки оказывают более значительное влияние на формирование поверхностных биоплёнок.

Материалы раздела 3.3 опубликованы в работах:

Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Влияние биогенных полиаминов на скольжение микобактерий в присутствии антибиотиков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26. – № 5. – С. 458-466.

Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Влияние активности алармон синтетаз микобактерий на уровни полифосфатов в присутствии антибиотиков // Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды: Тезисы докладов VI Всероссийской научной конференции с международным участием. (3-7 июля, Иркутск 2023). 2023. С. 80.

3.4 Изучение влияния полиаминов на синтез гликопептидолипидов и полифосфатов в процессе формирования биопленок и скольжения

3.4.1 Исследование способности микобактерий синтезировать полиамины

Известно, что полиамины способны модулировать широкий спектр функций бактерий, включая такие процессы, как антибиотикоустойчивость, биоплёнкообразование и скольжение микобактерий. Большинство организмов синтезирует полиамины самостоятельно. Прокариоты синтезируют

преимущественно путресцин и кадаверин, кроме того, бактерии не способны синтезировать спермин, в то время как эукариотические клетки продуцируют в основном спермидин и спермин [Igarashi, Kashiwagi, 2010]. Эти соединения накапливаются в почве или тканях организма-хозяина, где микобактерии могут контактировать с ними. Таким образом, патогенные виды микобактерий, попадая в организм хозяина, чаще контактируют с полиаминами, характерными для эукариот – спермином и спермидином.

Несмотря на то, что большинство грамположительных бактерий, включая микобактерии, не способны синтезировать полиамины, недавнее исследование показало наличие в геноме *M. smegmatis* генов, кодирующих ферменты синтеза путресцина – аргинин-декарбоксилазы и агматиназы [Замахеев и др., 2018]. Таким образом, предполагаемый путь синтеза путресцина в клетках микобактерий мог бы выглядеть следующим образом: аргинин → агматин → путресцин. Функционирование такого пути могло бы повлиять на достоверность выводов о влиянии полиаминов на уровни ГПЛ и полифосфатов, поэтому мы предварительно исследовали способность микобактерий синтезировать путресцин (см. раздел 2.7 «Флуориметрический метод определения полиаминов с использованием тонкослойной хроматографии»). В ходе эксперимента в питательную среду вносили аминокислоты-предшественники синтеза путресцина – аргинин и агматин. Пробы отбирали на поздней стационарной фазе роста клеточной культуры. Однако анализ гидролизатов клеток методом тонкослойной хроматографии не выявил наличие полиаминов ни в свободной форме, ни в связанном состоянии (Рисунок 28).

Несмотря на это, для проверки результатов был использован более чувствительный метод — высокоэффективная жидкостная хроматография (см. раздел 2.8 «Определение содержания полиаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»). Однако и этим методом путресцин в клетках микобактерий обнаружен не был (Рисунок 29).

Полученные нами результаты показывают, что при условиях культивирования, используемых нами во всех экспериментах, полиамины

микобактериями не синтезируются. Вероятно, для их синтеза требуются специфические условия, такие как воздействие стрессоров. Однако даже наступление стационарной фазы роста культуры, которая гипотетически могла бы инициировать адаптацию микроорганизмов, не инициировало синтез молекул полиаминов.

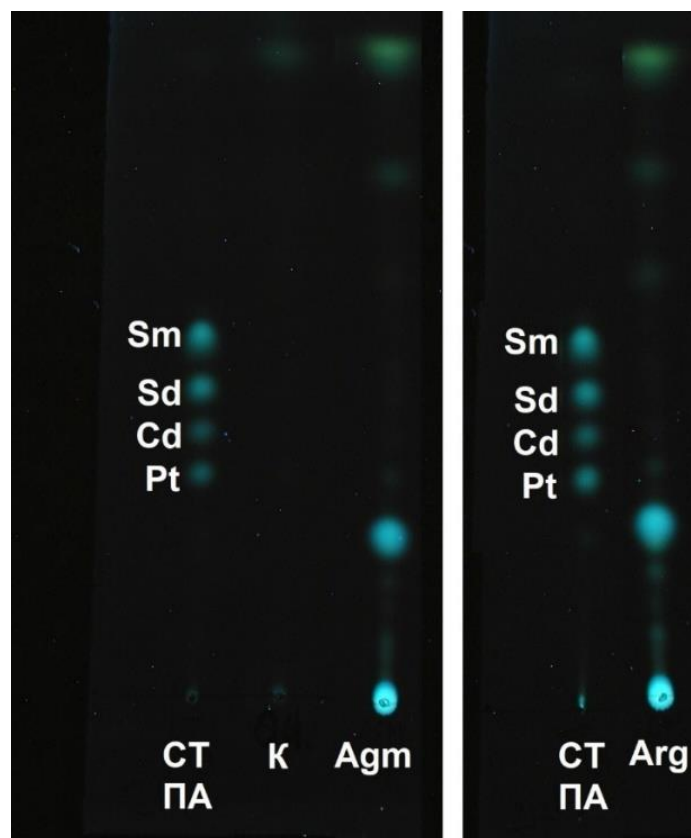


Рисунок 28. Хроматограмма дансилпроизводных полиаминов после кислотного гидролиза клеток *M. smegmatis*, выращенных в присутствии предшественников полиаминов. СТ ПА – стандарты полиаминов, К – гидролизаты клеток, выращенных без добавок предшественников путресцина, Аgm – гидролизаты полученные при росте бактерий в присутствии агматина, Arg – гидролизаты полученные при росте бактерий в присутствии аргинина, Pt – путресцин, Cd – кадаверин, Sd – спермидин, Sm – спермин [Zamakhaev *et al.* 2020].

Таким образом, регуляторный эффект полиаминов на уровни ГПЛ и полифосфатов, а также связанные с ними процессы скольжения и биоплёнкообразования, будет зависеть исключительно от наличия экзогенных полиаминов в окружающей среде. Для патогенных микобактерий такой средой, богатой полиаминами, является организм хозяина.

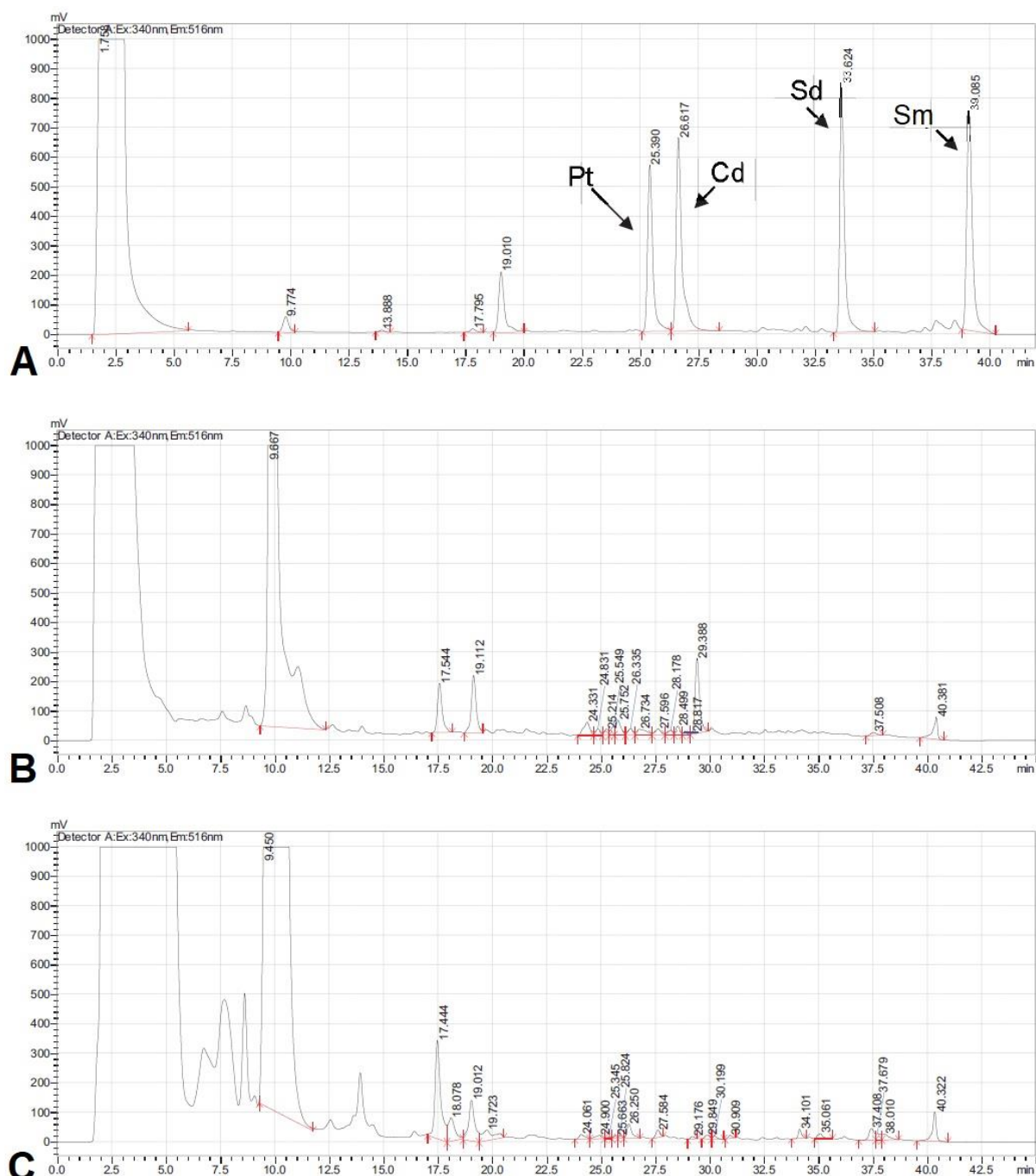


Рисунок 29. Хроматограмма ВЭЖХ дансилпроизводных полиаминов после кислотного гидролиза клеток *M. smegmatis*, выращенных в присутствии предшественников полиаминов. **(А)** Хроматограмма пробы со стандартным раствором полиаминов, Pt – путресцин, Cd – кадаверин, Sd – спермидин, Sm – спермин. **(В)** Хроматограмма пробы, полученной из культуры клеток, выращенных в присутствии аргинина (10 мг/мл). **(С)** Хроматограмма пробы, полученной из культуры клеток, выращенных в присутствии агматина (10 мг/мл) [Zamakhaev *et al.* 2020].

3.4.2 Влияние полиаминов на интенсивность синтеза гликопептидолипидов в процессе биопленкообразования

Известно, что полиамины модулируют процессы биоплёнкообразования у бактерий [Cardile *et al.*, 2017; Sobe *et al.*, 2017]. Точные механизмы их действия остаются неясными, однако большинство исследований связывают эффект полиаминов с их способностью взаимодействовать с ДНК и модулировать экспрессию генов. Мы изучали влияние полиаминов на двух уровнях: изменения внешнего вида биоплёнок при добавлении полиаминов в среду и их влияние на количество гликопептидолипидов (ГПЛ) в клеточной оболочке и уровни полифосфатов (см. раздел 3.3 «Изучение роли гликопептидолипидов и полифосфатов в формировании биоплёнок и скольжения микобактериальных клеток»). Это позволило оценить взаимосвязь между всеми параметрами и попытаться выстроить общий регуляторный механизм.

Добавление в питательную среду биогенных полиаминов спермидина и спермина вызывало выраженные фенотипические изменения биоплёнок у всех исследованных штаммов *M. smegmatis* (Рисунок 30).

Наиболее заметно было влияние спермина на биоплёнки мутантных штаммов с делециями генов. В этих случаях биоплёнки восстанавливали свою целостность и располагались на поверхности жидкой среды, предотвращая оседание на дно. У штамма дикого типа биоплёнки становились визуально более массивными при добавлении спермидина (Рисунок 30 С).

Добавление в среду 2 мМ спермина демонстрировало аналогичный результат (Рисунок 30 В), но эффект был значительно более выраженным. При этом штаммы с делециями генов полностью восстанавливали целостность поверхностной биоплёнки. У штамма дикого типа добавление спермина приводило к изменениям в фенотипе биоплёнки (Рисунок 30 В): наблюдалась выраженная складчатость поверхности, что отличало её от биоплёнок, выращенных без полиаминов.

Для количественной оценки этих изменений были измерены биомассы биоплёнок. Результаты показали, что спермин статистически значимо увеличивал массу биоплёнок у всех трёх штаммов микобактерий. Спермидин достоверно

повышал биомассу биоплёнки по сравнению с контролем только у штамма с двойной делецией генов *rel_{Msm}* и *relZ* (Рисунок 31).

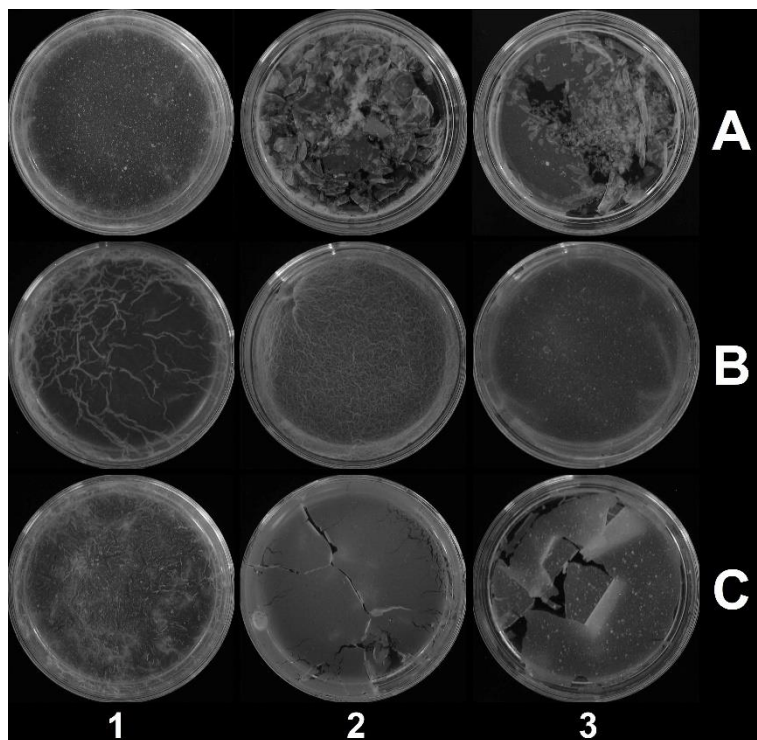


Рисунок 30 (фото). Поверхностные биоплёнки штаммов *M. smegmatis* mc² 155, выращенные в жидкой питательной среде в течение 72 часов без полиаминов (А), в присутствии спермина (В) и в присутствии спермидина (С). 1 – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, *rel_{Msm}* – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , *rel_{Msm}relZ* – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$. Оба полиамина добавляли до концентрации 2 мМ в среде.

Выявленное действие полиаминов на биоплёнкообразование микобактерий, по-видимому, прежде всего обусловлено изменением свойств клеточной поверхности бактерий и не связано не с повышением продукции межклеточного матрикса и стимуляцией клеточной пролиферации. На это указывают полученные нами ранее данные, согласно которым, полиамины воздействуют на величину заряда клеточной стенки, изменяя дзета-потенциал [Нестерова *и др.* 2020], что способствует восстановлению гидрофобности клеток и положительно сказывается на целостности биоплёнки. Измерение гидрофобности бактерий, которую выражали как процентную долю клеток, остающихся в водной фазе после экспозиции в системе из органического и неорганического растворителей (см.

раздел 2.11 «Определение гидрофобности бактериальной оболочки»), показало снижение гидрофобности клеток у мутантных штаммов, по сравнению со штаммом без делеций алармонсинтетаз. Полиамины, в свою очередь, восстанавливали гидрофобность прямо пропорционально степени положительного заряда поликатиона (Рисунок 31 В). Увеличение биомассы поверхностных биоплёнок под воздействием полиаминов, по-видимому, также происходит из-за усиления гидрофобности (Рисунок 31 В) и, как следствие, агрегации клеток, что препятствует процессам фрагментации биоплёнок и переходу клеток к планктонной форме существования.

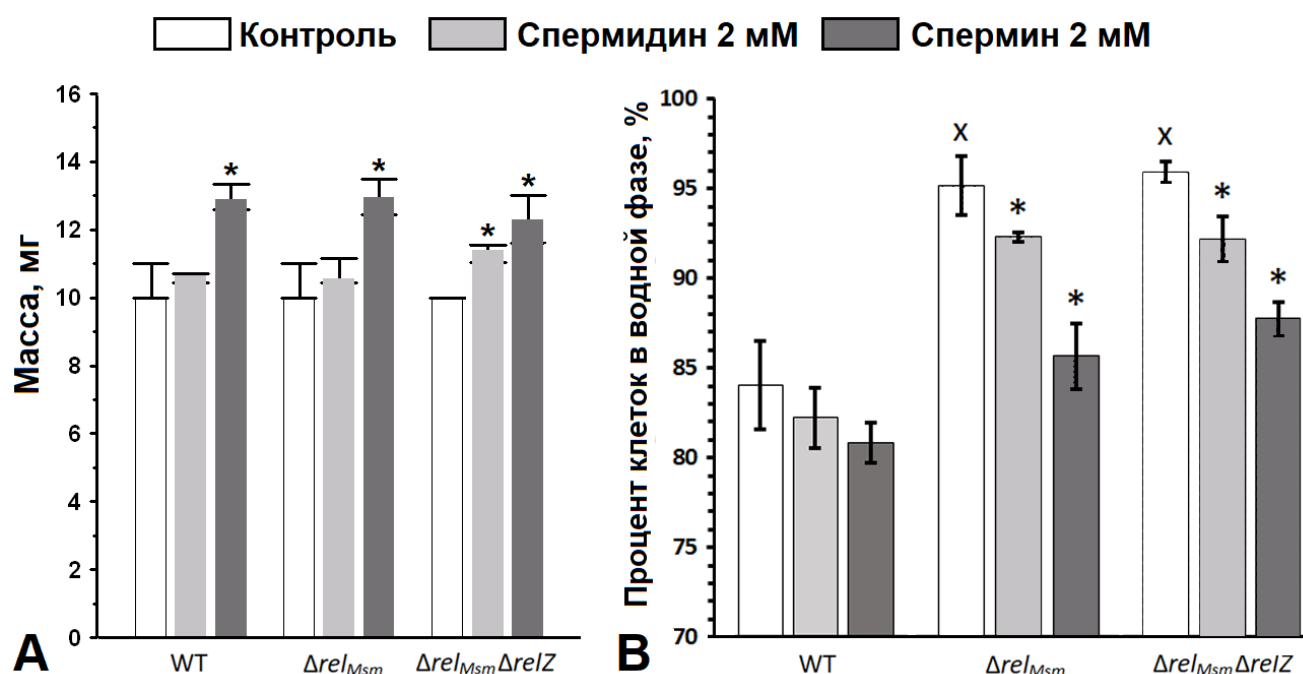


Рисунок 31. Влияние полиаминов на биоплёнкообразование микобактерий. **(А)** Биомасса биоплёнок *M. smegmatis* mc² 155, выращенных в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 в течение 72 ч в присутствии полиаминов. **(В)** Процент клеток штаммов *M. smegmatis* mc² 155, оставшихся в водной фазе после экспозиции с гексадеканом, от количества до экспозиции (снижение означает рост гидрофобности). * – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* mc², выращенного на среде без добавления полиамина (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$). ^x – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155 (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Согласно приведенным выше данным (см. раздел 3.3.1 «Роль гликопептидолипидов в скольжении и формировании биоплёнок *M. smegmatis*»), одним из ключевых факторов, участвующих в формировании гидрофобной поверхности клеточной оболочки микобактерий, являются гликопептидолипиды. Исходя из этого, нами проведена сравнительная оценка содержания ГПЛ в клеточных оболочках микобактерий, выращенных в присутствии полиаминов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что спермин статистически значительно повышает количество ГПЛ в клеточной оболочке микобактерий (Рисунок 32), что согласуется с первоначальными выводами о положительном воздействии полиаминов на биоплёнкообразование посредством стимуляции синтеза гликопептидолипидов. Это предотвращало распад, фрагментацию и оседание фрагментов биоплёнки (Рисунок 5).

Увеличение количества ГПЛ у штамма дикого типа (WT) также сопровождалось повышением гидрофобности поверхности (Рисунок 31 В), что препятствовало естественному процессу распада зрелых биоплёнок (Рисунок 30 В). В результате, при удалении жидкой фазы с планктонными клетками, большая часть клеток и матрикса сохранялась в составе биоплёнки, что приводило к увеличению её биомассы (Рисунок 31).

Действие спермидина на содержание ГПЛ в клеточной оболочке оказалось менее выраженным по сравнению со спермином. У родительского штамма и штамма с двойной делецией спермидин снижал содержание ГПЛ, тогда как у штамма с делецией только гена *rel_{Msm}* вызывал лишь незначительные изменения (Рисунок 33).

Несмотря на то, что внесение спермидина частично восстанавливало целостность биоплёнок у делеционных штаммов, значительного увеличения уровней ГПЛ выявлено не было. Это, вероятно, связано как с меньшей активностью спермидина. Тем не менее, можно предположить, что восстановление биоплёнок также происходило за счёт модуляции гидрофобности поверхности микобактерий.

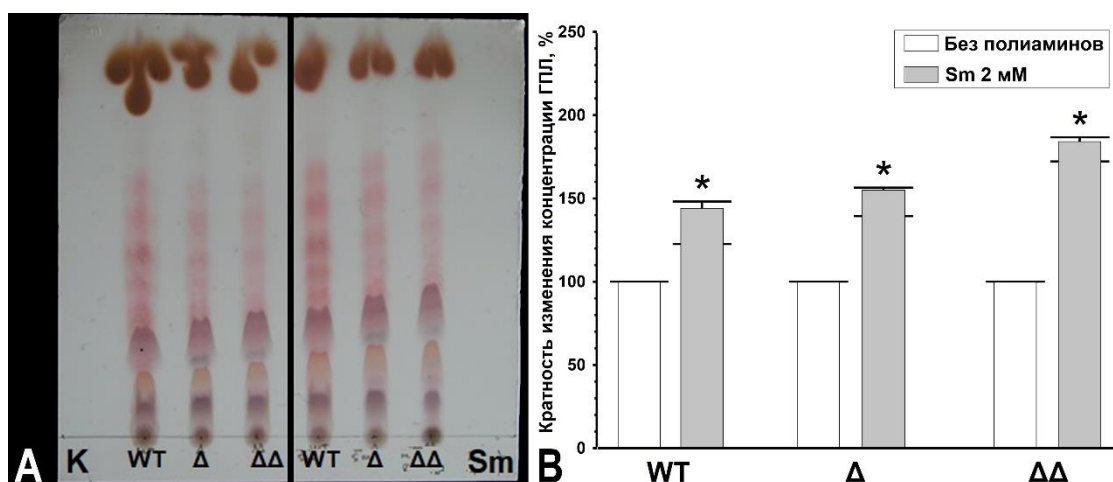


Рисунок 32. Зависимость содержания гликопептидолипидов в клетках *M. smegmatis* mc² 155 от спермина. (А) (фото) Хроматограмма спектра ГПЛ экстрагированных из штаммов бактерий *M. smegmatis* mc² 155, выращенных в присутствии 2 мМ спермина и без него. (В) Кратность возрастания содержания ГПЛ (%) в ответ на добавку 2 мМ спермина. WT – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, Δ – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , $\Delta\Delta$ – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm}\Delta relZ$, Sm – спермин, К – контроль без полиамина. * – Статистически значимое отличие от контроля, выращенного без добавления полиамина (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

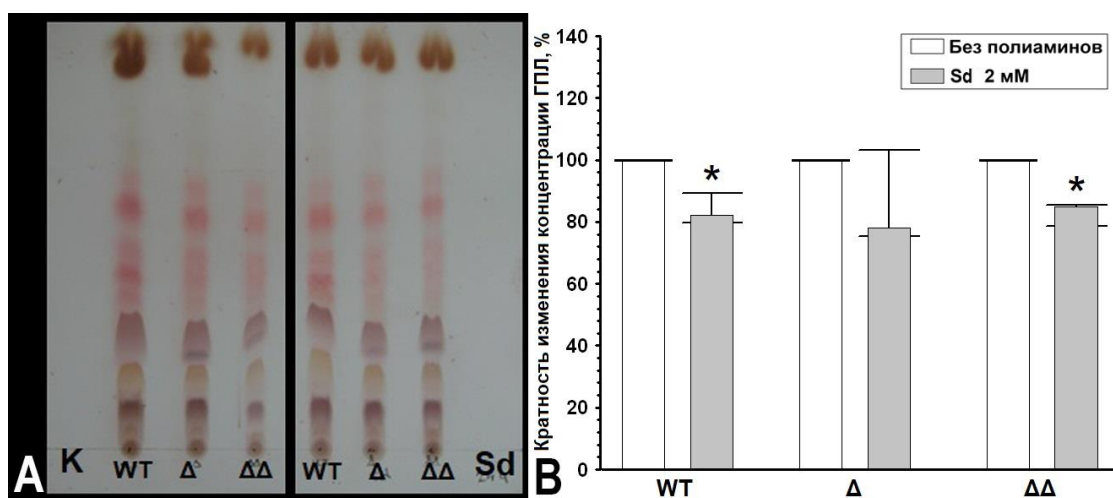


Рисунок 33. Зависимость содержания гликопептидолипидов в клетках *M. smegmatis* mc² 155 от спермидина. (А) (фото) Хроматограмма спектра ГПЛ экстрагированных из штаммов бактерий *M. smegmatis* mc² 155, выращенных в присутствии 2 мМ спермидина и без него. (В) Кратность возрастания содержания ГПЛ (%) в ответ на добавку 2 мМ спермидина. WT – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, Δ – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , $\Delta\Delta$ – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm}\Delta relZ$, Sd – спермидин, К – контроль без полиамина. * – Статистически значимое отличие от контроля, выращенного без добавления полиамина (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Полученные результаты согласуются с другими наблюдениями: усилением агрегации клеток микобактерий в жидкой культуре (Рисунок 35) и изменением кривых роста штаммов в присутствии полиаминов (Рисунок 34 А). В частности, спермин и спермидин существенно снижали оптическую плотность культур всех штаммов в стационарной фазе роста. Несмотря на снижение оптической плотности, сухая биомасса бактериальной культуры, взятая в одинаковом объёме среды культивирования, не изменялась под действием полиаминов (Рисунок 34 В). В то же время размеры бактериальных агрегатов статистически значимо росли при внесении в среду спермина (Рисунок 35)

Снижение оптической плотности связано с усилением агрегации бактерий (Рисунок 40), при этом увеличение размеров агрегатов происходило как при добавлении полиамина в среду, так и при делеции генов алармонсинтетаз (Рисунок 35 А). Склонность бактерий штамма *Mycobacterium smegmatis* mc² к агрегации является известным фактом [DePas, Bergkessel, Newman. 2019], поэтому при выращивании в среду культивирования всегда добавляют Твин 80 для предотвращения слипания. Тем не менее, присутствие стандартной концентрации Твин 80, равной 0,05% от общего объёма культуральной среды, не позволяло предотвратить агрегацию как штаммов с делециями генов алармонсинтетаз, так и агрегацию, вызванную полиаминами. Полученные данные о склонности мутантных штаммов к агрегации обусловили отказ от использования показателей оптической плотности для контроля биомассы микобактерий в стационарной фазе роста (после 24 часов культивирования). Также эти данные учитывались в экспериментах, где требовалось обеспечить одинаковое количество биомассы у штаммов в стационарной фазе роста.

Эффект спермина на агрегацию микобактерий, вероятно, вызван ростом концентрации ГПЛ (Рисунок 32) в клеточной стенке и изменением гидрофобности поверхности (Рисунок 31 В). В то же время рост размеров агрегатов у мутантных штаммов был обратно пропорционален изменению уровней ГПЛ в клеточной оболочке. Механизм влияния алармонсинтетаз на агрегацию микобактерий нуждается в дальнейшем исследовании.

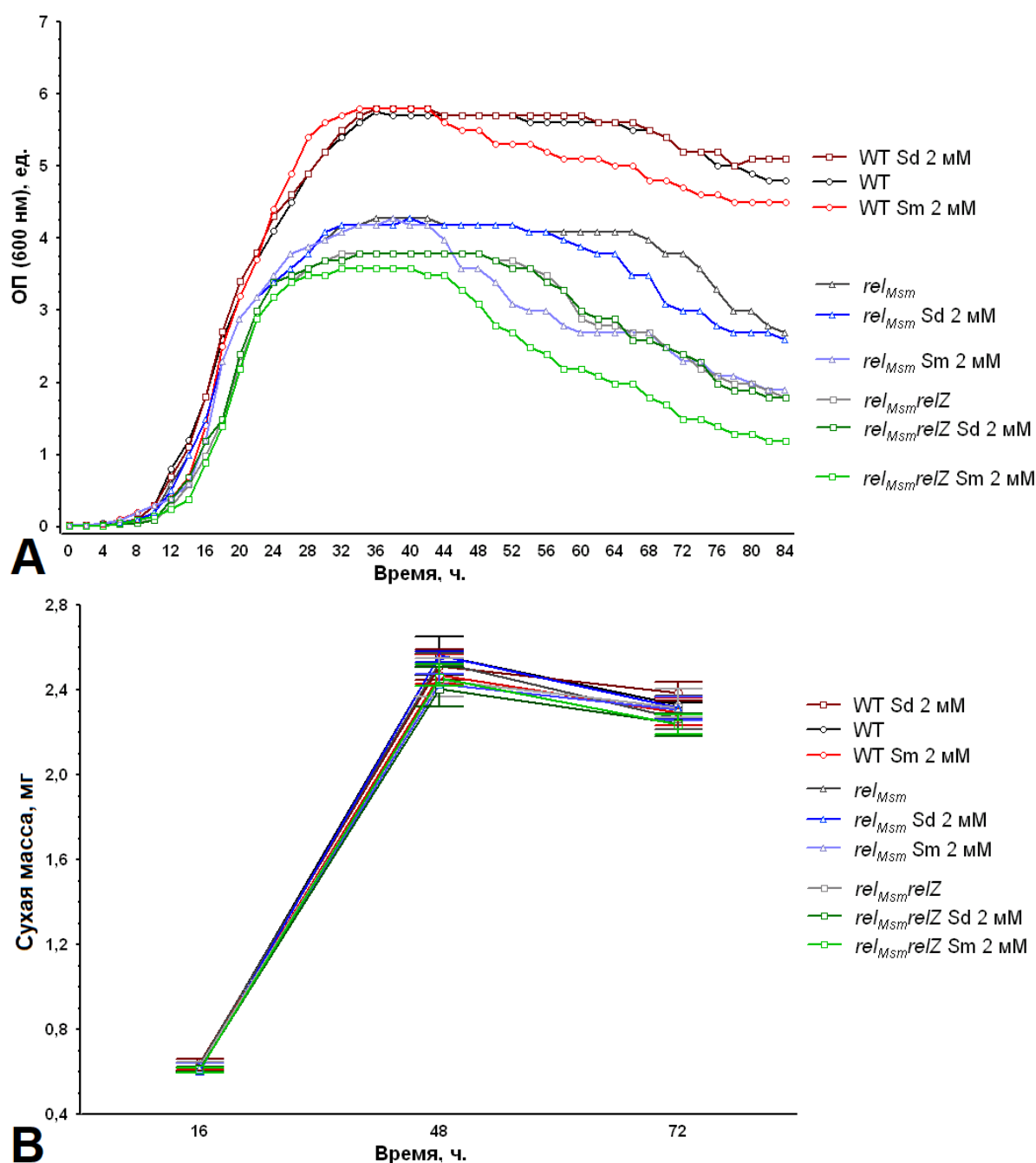


Рисунок 34. Влияние спермидина (Sd) и спермина (Sm) на изменение оптической плотности и сухой биомассы культур штаммов *M. smegmatis* mc² 155 при периодическом культивировании на жидкой среде Middlebrook 7H9. **(А)** Изменение оптической плотности культур штаммов *M. smegmatis* mc² 155, выращенных в присутствии полиаминов и без. **(В)** Изменение сухой биомассы культур штаммов *M. smegmatis* mc² 155, выращенных в присутствии полиаминов и без. WT – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, rel_{Msm} – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , $rel_{Msm} relZ$ – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$, Sd – спермидин, Sm – спермин.

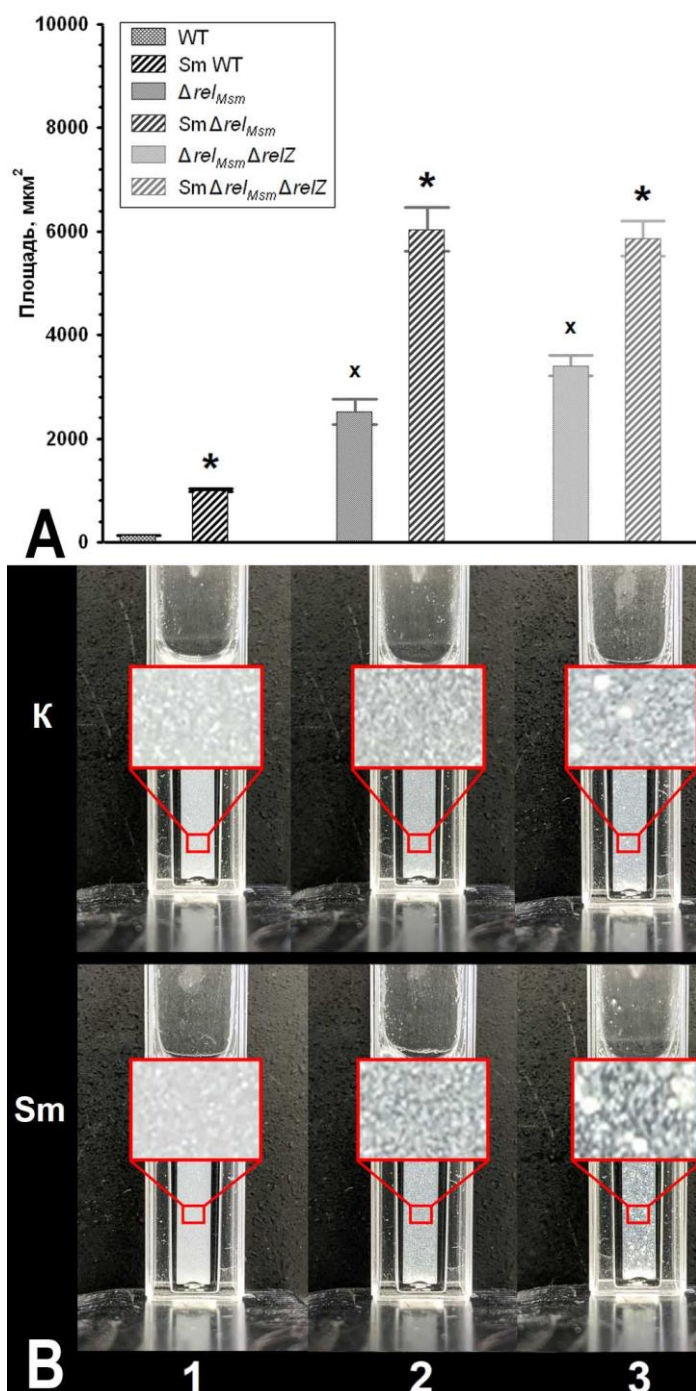


Рисунок 35. Влияние спермина на агрегацию клеток штаммов *M. smegmatis* mc² 155. (A) Влияние 2 мМ спермина на размеры клеточных агрегатов у штаммо *M. smegmatis* mc² 155 (B) (фото) Агрегация клеток *M. smegmatis* mc² 155 в среде без спермина (K) и в присутствии спермина 2 мМ (Sm). 1 – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155, 2 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 с делецией гена Δrel_{Msm} , 3 – штамм *M. smegmatis* mc² 155 с делециями генов $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$. * – Статистически значимое отличие от аналогичной контрольной колонии без ПА (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$), x – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Анализ ростовых характеристик и способности штаммов к агрегации позволил глубже оценить процессы скольжения и биоплёнкообразования микобактерий, а также влияние на них генов *rel_{Msm}* и *relZ*. Во-первых, разница в площадях скользящих колоний не связана со скоростью роста разных штаммов, поэтому отличия в скольжении вызваны, в первую очередь именно с участием генов *rel_{Msm}* и *relZ* в процессе скольжения, а не деления клеток (см. раздел 3.1.2 «Влияние активности генов алармонсинтетаз на скольжение микобактерий»). Во-вторых, несмотря на склонность делеционных штаммов к агрегации, это не способствовало образованию биоплёнок. Более того, агрегация не препятствовала штамму с делецией гена *rel_{Msm}* скользить значительно лучше, чем родительскому штамму.

Таким образом, содержание ГПЛ в клеточных оболочках микобактерий коррелирует со способностью бактерий формировать поверхностные биоплёнки. Добавление полиаминов, таких как спермидин и спермин, в питательную среду также модулировало накопление ГПЛ в клеточной оболочке *M. smegmatis* mc² 155. Эти данные позволяют сделать вывод, что биомасса и целостность биоплёнок микобактерий напрямую зависят от содержания ГПЛ, которые обеспечивают гидрофобность клеточной оболочки и способствуют удержанию биоплёнок на поверхности, а полиамин спермидин способствует биоплёнкообразованию, увеличивая количество ГПЛ на клеточной поверхности.

3.4.3 Влияние полиаминов на эффективность антибиотиков в отношении биоплёночных сообществ микобактерий

Несмотря на способность спермина стимулировать биоплёнкообразование и увеличивать массу биоплёнок (см. раздел 3.4.2 «Влияние полиаминов на интенсивность синтеза гликопептидолипидов в процессе биоплёнкообразования»), его присутствие вместе с DMNP в культуральной среде существенно снижало адаптационные возможности штаммов микобактерий.

Совместное действие спермина и DMNP приводило к уменьшению минимальной концентрации, подавляющей биоплёнкообразование (МКПБ), а

также минимальной бактерицидной концентрации (МБК) в отношении микобактерий (Таблица 8). При этом разница между этими двумя концентрациями увеличивалась, что указывало на усиление эффективности против биоплёночных сообществ. Чувствительность микобактерий к DMNP возрастала пропорционально числу делеционных мутаций в штаммах. У штамма с двойной делецией генов биоплёнкообразование практически полностью подавлялось, так как его МКПБ оказалась ниже 0,02 МПК.

Таблица 8 – Влияние спермина на минимальные концентрации DMNP подавляющие формирование биоплёнок (МКПБ) и планктонных клеток (МБК). Значения выражены в единицах МПК для каждого антибиотика.

	WT	WT + Sm 2mM	Δrel_{Msm}	$\Delta rel_{Msm} +$ Sm 2mM	$\Delta rel \Delta relZ$	$\Delta rel \Delta relZ +$ Sm 2mM
МКПБ	2,4	0,4	1,6	0,07	1,2	0,02
МБК	4,7	4,7	4,7	1,6	3,2	0,8

* МБК – минимальная бактерицидная концентрация, МКПБ – минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование, Sm – спермин.

Добавление спермина также повышало чувствительность микобактерий к рифампицину. Сравнение МКПБ и МБК рифампицина, а также их показателей при совместном применении со спермином, показало, рифампицина значительно снижалась при добавлении 2 mM спермина для всех исследованных штаммов, что свидетельствовало о повышении эффективности антибиотика против биоплёнкообразования. Тем не менее, эффективность рифампицина против клеток стационарной фазы оставалась низкой (Таблица 9). Снижение МБК и МКПБ у штамма с двойной делецией при совместном действии спермина и рифампицина, вероятно, связано с нарушением адаптационных процессов, вызванным дефицитом алармонсинтетаз (p)ppGpp – одного из ключевых регуляторов ответа на стрессовые воздействия. Делеция генов *rel* нарушает синтез (p)ppGpp, что делает микобактерии уязвимыми различным стрессам, в том числе антибиотикам и активным формам кислорода [Zhai *et al.*, 2023; Qi *et al.*, 2024]. Несмотря на то, что полиамины больше известны как молекулы, способствующие защите от окислительного стресса, спермин и другие полиамины при высоких концентрациях

сам способен индуцировать образование активных форм кислорода [Rhee *et al.*, 2007]. В результате, окислительный стресс, который мог быть вызван спермином, мог быть причиной усиления действия рифампицина, ещё больше снижая МБК и МКПБ. Данная версия также согласуется с полученными нами данными, поскольку устойчивость к совместному действию спермина и рифампицина последовательно снижалась с ростом числа делеций генов алармонсинтетаз (Таблица 9).

Таблица 9 – Влияние спермина на минимальные концентрации рифампицина, подавляющие формирование биоплёнок (МКПБ) и планктонных клеток (МБК). Значения выражены в единицах МПК для каждого антибиотика.

	WT	WT + Sm 2mM	Δrel_{Msm}	$\Delta rel_{Msm} +$ Sm 2mM	$\Delta rel \Delta relZ$	$\Delta rel \Delta relZ +$ Sm 2mM
МКПБ	4,7	1,2	1,6	0,2	1,6	0,05
МБК	23	23	23	23	23	10,5

* МБК – минимальная бактерицидная концентрация, МКПБ – минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование, Sm – спермин.

Стрептомицин был единственным исследованным антибиотиком, при котором дополнительное внесение в среду полиамина не снижало показателей МКПБ и МБК. Наоборот, эти показатели возрастали. В частности, для родительского штамма и штамма с одной делецией, в присутствии спермина показатели МКПБ и МБК стрептомицина увеличивались до уровней, наблюдаемых для DMNP, когда он использовался без спермина. Это снижение эффективности стрептомицина под воздействием спермина значительно ограничивает его потенциальное применение, особенно учитывая, что ткани млекопитающих содержат полиамины, которые микобактерии способны транспортировать из внешней среды. В данном случае DMNP получит преимущество над используемыми в текущей практике антибиотиками (Таблица 10), поскольку эффективность его действия не снижалась в присутствии полиаминов.

Таким образом, полиамины, несмотря на их роль в восстановлении целостности биоплёнок через усиление гидрофобности бактериальных поверхностей (Рисунок 31 В), способствуют повышению чувствительности

микобактерий к рифампицину и DMNP. Это уменьшает эффективность биоплёнкообразования как адаптивной реакции на стрессовые воздействия.

Таблица 10 – Влияние спермина на минимальные концентрации стрептомицина, подавляющие формирование биоплёнок (МКПБ) и планктонных клеток (МБК). Значения выражены в единицах МПК для каждого антибиотика.

	WT	WT + Sm 2mM	Δrel_{Msm}	$\Delta rel_{Msm} +$ Sm 2mM	$\Delta rel \Delta relZ$	$\Delta rel \Delta relZ +$ Sm 2mM
МКПБ	0,8	1,2	0,8	1,2	1,2	0,6
МБК	1,6	4,7	1,6	7	2,4	3,2

* МБК – минимальная бактерицидная концентрация, МКПБ – минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование, Sm – спермин.

3.4.4 Влияние полиаминов на интенсивность синтеза гликопептидолипидов в процессе скольжения

Внесение в питательную среду биогенных полиаминов спермидина и спермина, которые являются наиболее характерными для тканей многоклеточных организмов [Igarashi, Kashiwagi, 2010], вызывало разнонаправленный эффект в модуляции скольжения штаммов на полужидкой среде (Рисунок 36).

Спермидин статистически значимо увеличивал площади скользящих колоний родительского штамма и штамма с делецией гена rel_{Msm} , а также незначительно увеличивал площади у штамма с двойной делецией генов rel_{Msm} и $relZ$. В то же время спермин, напротив, уменьшал площади скользящих колоний у всех исследованных штаммов, причем степень ограничения скольжения возрастала прямо пропорционально числу делеций в геноме микобактерий (Рисунок 37). Несмотря на это, количество КОЕ/мл культур штаммов аналогичной плотности, культивировавшихся в тех же условиях, но в жидкой среде, не отличались друг от друга (Рисунок 37). Таким образом, полиамины не влияли на скорость роста биомассы микобактериальных колоний, как и в случае с измерением оптической плотности (Рисунок 34 В), а модулировали непосредственно скольжение.

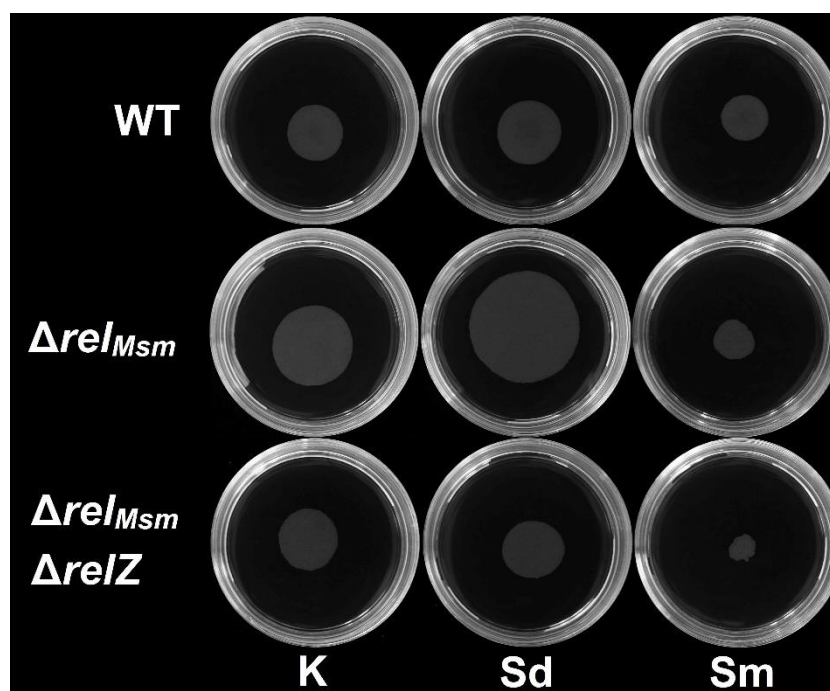


Рисунок 36 (фото). Влияние полиаминов на размер площадей скользящих колоний штаммов *M. smegmatis* mc² 155 после 16 часов культивирования. WT – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, *rel_{Msm}* – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , *rel_{Msm}relZ* – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$, Sd – спермидин 2 мМ, Sm – спермин 2 мМ.

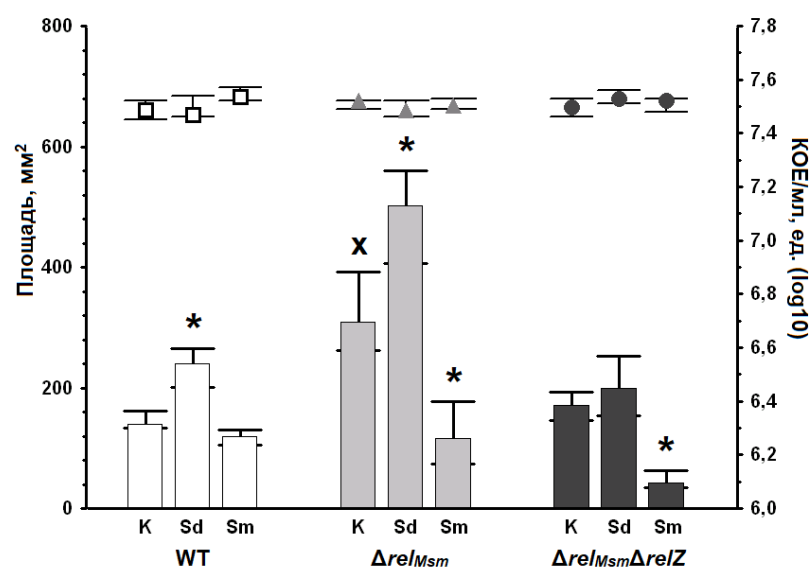


Рисунок 37. Влияние полиаминов спермидина и спермина на площади скользящих колоний штаммов *M. smegmatis* mc² 155 и КОЕ/мл после 16 часов культивирования. WT – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, *rel_{Msm}* – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , *rel_{Msm}relZ* – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$, Sd – спермидин, Sm – спермин, * – Статистически значимое отличие от аналогичной контрольной колонии без ПА (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$), x – Статистически значимое отличие от аналогичной родительского штамма *M. smegmatis* (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Изменения площадей скользящих колоний в присутствии полиаминов сопровождались соответствующими изменениями в скорости продвижения монослоя по поверхности (Таблица 11). Спермидин способствовал увеличению скорости продвижения всех штаммов, тогда как спермин, наоборот, снижал скорость их скольжения.

Таблица 11. Влияние полиаминов на скорость скольжения монослоя штаммов *M. smegmatis* (мкм/ч).

	WT	Δrel_{Msm}	$\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$
Без полиаминов	15,94 ± 0,34	18,65 ± 0,47	15 ± 1,12
Sd 2 мМ	19,9 ± 1,39	23,96 ± 1,88	19,48 ± 0,83
Sm 2 мМ	13,23 ± 1	14,27 ± 0,92	13,33 ± 0,76

WT – родительский штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций, rel_{Msm} – штамм *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} , $rel_{Msm} relZ$ – штамм *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$, Sd – спермидин, Sm – спермин. В таблице приведены средние скорости движения монослоя микобактерий, а также стандартное отклонение данных значений. Измерения проводились через 17 часов после внесения культуры на полужидкий агар.

Поскольку изменение площади колонии и скорости продвижения монослоя может быть вызвано не только изменениями поверхностных свойств бактерий, мы провели дополнительное исследование межклеточного пространства в монослоях скользящих колоний. В основе скольжения лежит давление клеток друг на друга, поэтому плотность их расположения отражает силу, необходимую для продвижения по поверхности. Чем больше межклеточное пространство, тем меньше давления требуется для движения и тем легче происходит скольжение. Соответственно, уменьшение межклеточного пространства затрудняет скольжение, поскольку бактерии сталкиваются с большим сопротивлением.

Если бы изменение площади скользящих колоний было связано исключительно с изменением скорости роста бактериальной культуры, это не влияло бы на межклеточное пространство и свойства клеточной оболочки. Поэтому мы исследовали края монослоев колоний штаммов с делециями одной или двух алармонсинтетаз, а также родительского штамма, и оценили влияние полиаминов

на межклеточное пространство в монослое. Во всех случаях изменение площади скользящих колоний из-за добавления полиамина коррелировало с изменением площади межклеточного пространства (Рисунок 38).

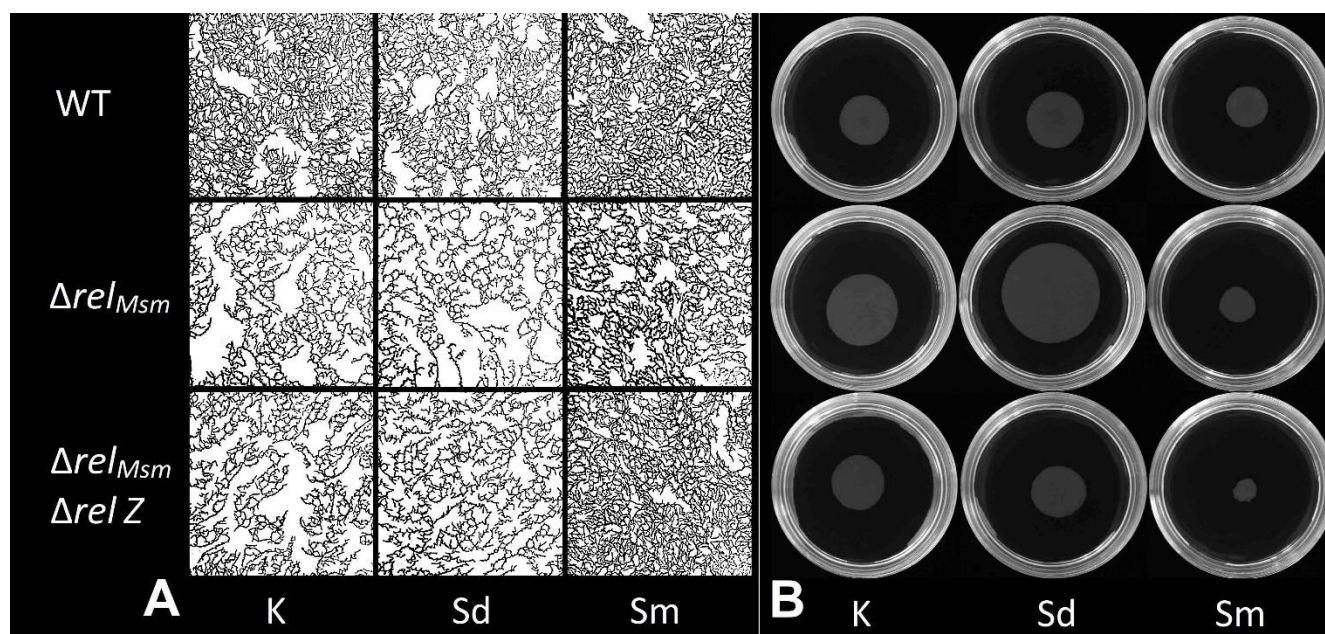


Рисунок 38. Сравнительная оценка влияния полиаминов на площадь и межклеточное пространство монослоя скользящих колоний *M. smegmatis* mc² 155. (А) – микрофотографии монослоя колоний. (В) (фото) – скользящие колонии *M. smegmatis*. К – скользящие колонии, выращенные на среде без добавок полиаминов, Sd – скользящие колонии, выращенные на среде с добавлением 2 мМ спермидина, Sm – скользящие колонии, выращенные на среде с добавлением 2 мМ спермина.

Сравнение микрофотографий монослоёв скользящих колоний показало, что изменения межклеточного пространства прямо коррелировали с изменением площади колоний. Клетки мутантных штаммов с делециями генов располагались дальше друг от друга, чем клетки родительского штамма. Влияние полиаминов на площади скользящих колоний и межклеточное пространство также имело прямую корреляцию (Рисунки 39).

Таким образом, результаты исследования монослоя скользящих колоний микобактерий свидетельствуют о том, что изменения площадей колоний в присутствии полиаминов вызваны модуляцией процесса скольжения, а не изменением параметров пролиферации бактерий.

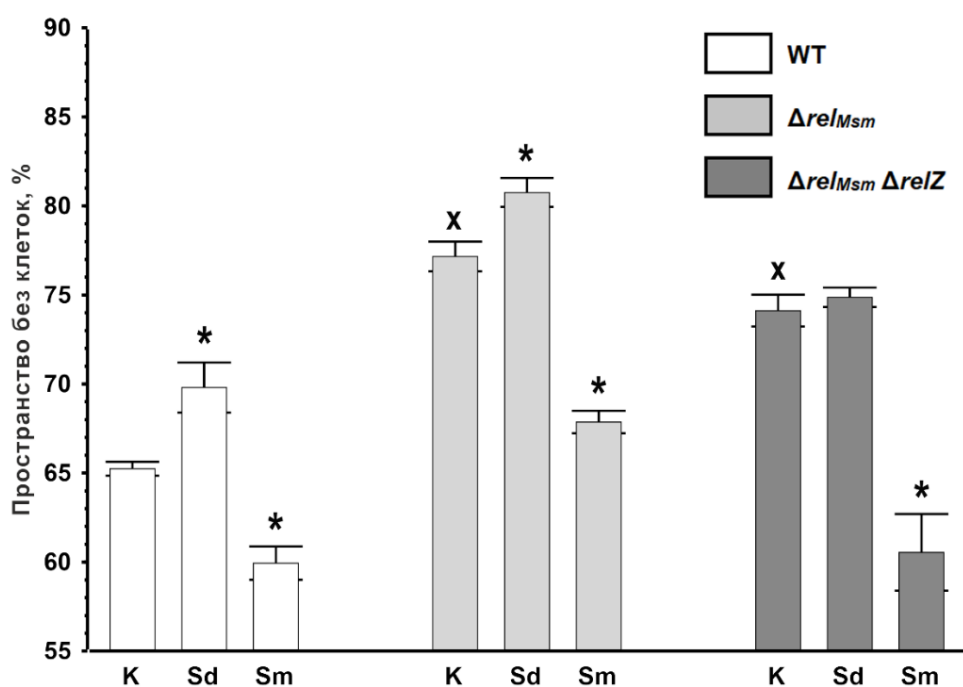


Рисунок 39. Сравнение межклеточного пространства в монослоях скользящих колоний штаммов *M. smegmatis* mc² 155 в присутствии полиаминов спермидина и спермина. К – скользящие колонии, выращенные на среде без добавок полиаминов, Sd – скользящие колонии, выращенные на среде с добавлением 2 мМ спермидина, Sm – скользящие колонии, выращенные на среде с добавлением 2 мМ спермина. * – Статистически значимое отличие от контрольной колонии в тех же условиях, но в отсутствие ПА (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$), x – Статистически значимое отличие родительского штамма *M. smegmatis* (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Ранее было показано, что миллимолярные концентрации биогенных полиаминов, как правило, не оказывают антибактериального действия, а напротив, способствуют росту и адаптации клеток к неблагоприятным условиям [Yoshida *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2004]. Тем не менее, в своём обзоре, посвящённом протекторным функциям полиаминов, Rhee с соавторами также отмечает, что полиамины при больших концентрациях могут индуцировать формирование активных форм кислорода и, таким образом, вызывать окислительный стресс [Rhee *et al.*, 2007]. В наших экспериментах добавление полиаминов не влияло ни на КОЕ/мл (Рисунок 37), ни на биомассу микобактериальных культур (Рисунок 34 В), а изменение оптической плотности, скорее всего было связано с усилением

агрегации клеток (Рисунок 35). Поэтому уменьшение площадей колоний не связано с бактерицидным или бактериостатическим эффектом полиаминов, а является модуляцией непосредственно скольжения микобактерий.

Внесение спермина в среду увеличивало содержание ГПЛ, но уменьшало площадь скользящих колоний. В то же время спермидин, который значительно усиливал скольжение, практически не изменял уровень ГПЛ. Эти данные свидетельствуют об отсутствии прямой зависимости между содержанием ГПЛ, гидрофобностью поверхности и способностью бактерий к скольжению. Данный результат не согласуется с общепринятой моделью скольжения [Recht *et al.*, 2000], но существуют и другие факты, которые нельзя описать данной моделью. В похожем исследовании влияния содержания ГПЛ на профиль колоний и способность к скольжению *Mycobacterium abscessus*, авторы отмечают, что делеция гена *tab_3083c* делала морфотип колоний мутантного штамма более гладким, а также усиливала его способность скользить, но не влияла на уровни ГПЛ [Liu *et al.*, 2021]. Таким образом, результаты исследования с Liu соавторами также демонстрируют отсутствие строгой прямой корреляции между концентрациями ГПЛ и способностью микобактерий к скольжению.

Всё это указывает на то, что механизм скольжения микобактерий нуждается в дальнейшем исследовании, а модель скольжения в дополнении. Вероятно, в данном процессе принимают участие и другие факторы, формирующие внешнюю поверхность микобактерий, помимо тех, которые исследованы нами или обсуждены на основании анализа источников литературы по данному вопросу.

3.4.5 Влияние полиаминов на интенсивность синтеза полифосфатов в процессе биоплёнкообразования и скольжения

В литературе, в последнее время, существенное внимание уделено исследованию механизмов адаптации бактерий к различным стрессам. Несмотря на то, что нами ранее показано положительное воздействие полиаминов на выживаемость бактерий при стрессовых воздействиях [Tkachenko *et al.*, 2001; Tkachenko *et al.*, 2012], полный механизм их адаптивных эффектов остается

предметом дальнейших исследований (см. раздел 1.5.2 «Основные функции полиаминов»). В то же время, наряду с полиаминами, полифосфаты также рассматриваются как ключевые внутриклеточные регуляторы адаптации бактерий к стрессовым условиям (см. раздел 1.4.4 «Влияние полифосфатов на физиологические процессы бактерий»). Исследование влияния экзогенных полиаминов на уровни полифосфатов в клетках микобактерий может способствовать более глубокому пониманию механизмов регуляции адаптационных процессов как на уровне отдельных клеток, так и на уровне бактериальных сообществ, таких как биоплёнки или скользящие колонии.

Нами показано, что добавление одного из наиболее распространенных биогенных полиаминов – спермидина – в среду культивирования приводит к снижению уровней полифосфатов у всех исследованных штаммов *M. smegmatis* в первые двое суток после начала культивирования (Рисунок 40). Через 72 часа роста, у штамма Δrel_{Msm} уровень внутриклеточных полифосфатов восстанавливался до значений, соответствующих уровню, наблюдаемому при культивировании без полиамина. В клетках дикого типа, напротив, наблюдалось незначительное снижение полифосфатов в течение всей стационарной фазы. У штамма с двойной делецией генов в стационарной фазе отмечалось увеличение уровня полифосфатов.

Добавление спермина в концентрации 2 мМ вызывало сходные изменения, однако его эффект был более выраженным, чем у спермидина (Рисунок 41). У штамма Δrel_{Msm} обнаруживалась наибольшая концентрация полифосфатов, хотя абсолютные значения были ниже, чем при культивировании без полиамина. Бактерии штамма $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$ также содержали более низкие уровни полифосфатов на протяжении экспоненциальной и первой половины стационарной фазы по сравнению с ростом без спермина. В клетках дикого типа уровень полифосфатов практически не изменялся под действием спермина. Общее снижение уровней полифосфатов, вызванное внесением полиаминов, было характерным для всех трёх штаммов. Поскольку высокие уровни внутриклеточных полифосфатов ассоциируются с адаптацией бактерий к стрессам [Shiba *et al.*, 1997],

снижение их концентрации может ослаблять адаптивные способности микобактерий.

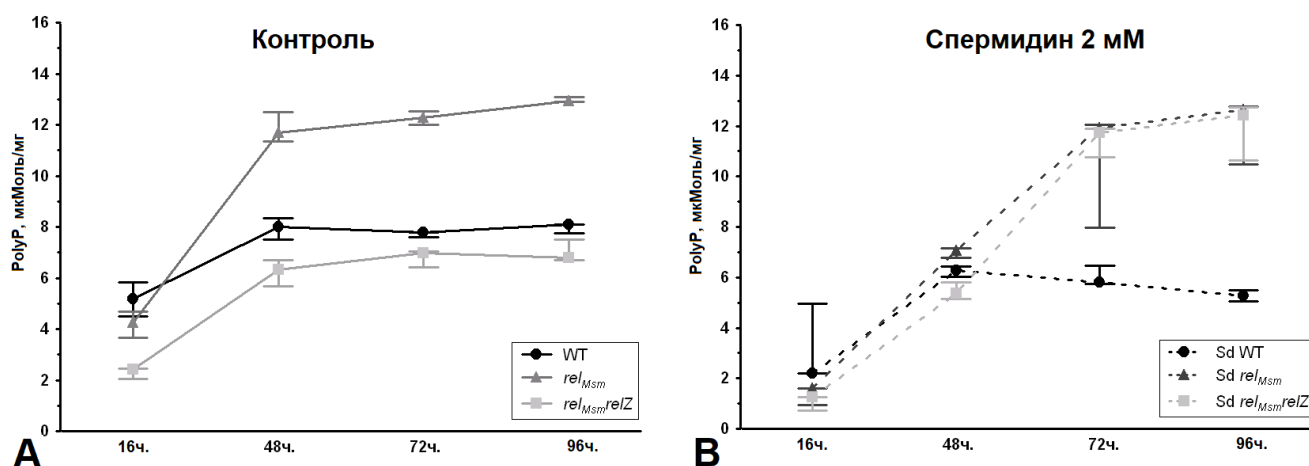


Рисунок 40. Влияние 2 мМ спермидина на уровни полифосфатов в клетках штаммов *M. smegmatis* mc² 155.

(А) – уровни полифосфатов в клетках микобактерий без добавления в среду полиаминов. (В) – уровни полифосфатов в клетках микобактерий при добавлении в среду 2 мМ спермидина. Полиамин вносили в питательную среду изначально вместе с бактериальной культурой. Sd – спермидин, PolyP – полифосфаты.

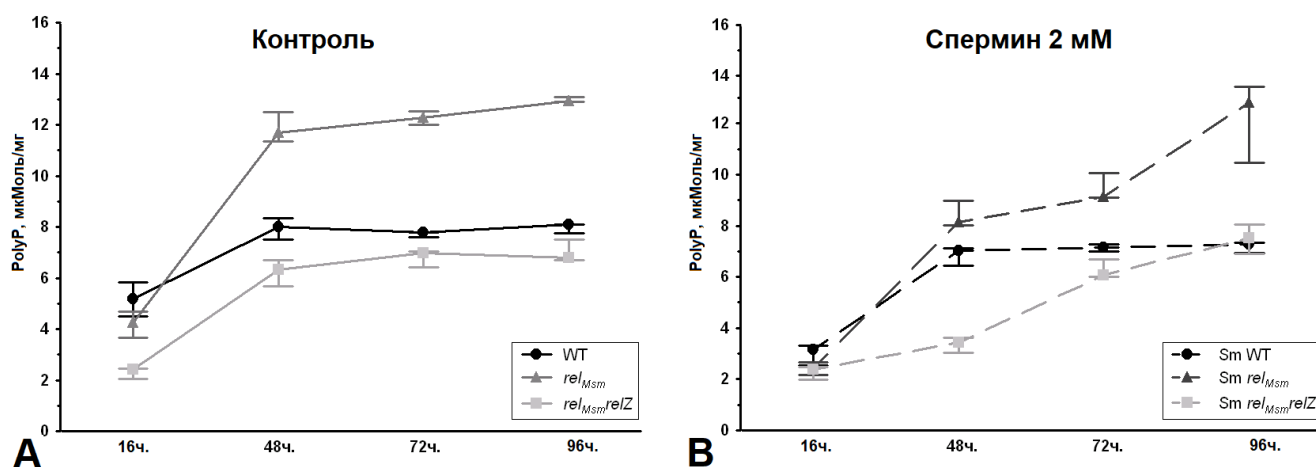


Рисунок 41. Влияние 2 мМ спермина на уровни полифосфатов в клетках штаммов *M. smegmatis* mc² 155. А – уровни полифосфатов в клетках микобактерий без добавления в среду полиаминов. В – уровни полифосфатов в клетках микобактерий при добавлении в среду 2 мМ спермина. Полиамин вносили в питательную среду изначально вместе с бактериальной культурой. Sm – спермин, PolyP – полифосфаты.

Однако изменения внутриклеточных уровней полифосфатов в присутствии полиаминов не коррелировали с процессом скольжения (Рисунок 37). Поэтому

высокий уровень корреляции между изменениями уровней полифосфатов и изменением площадей скользящих колоний у делеционных штаммов (см. раздел 3.3.2 «Роль полифосфатов в скольжении и формировании биоплёнок *M. smegmatis*») не сохранился при аналогичных изменениях, но вызванных действием полиаминов. Таким образом, связь между внутриклеточным уровнем полифосфатов и скольжением является маловероятной и механизм влияния полиаминов на скольжение микобактерий нуждается в дальнейшем изучении.

3.4.6 Совместное влияние полиаминов, традиционных антибиотиков, а также ингибитора персистенции DMNP на интенсивность синтеза полифосфатов

Для исследования влияния антибиотиков на уровни внутриклеточных полифосфатов микобактерий, мы использовали такие концентрации антибиотиков, которые не снижали количество КОЕ/мл после 24 часов воздействия в условиях, аналогичных культивированию клеток для последующего измерения PolyP и которые мы определили ранее (см. раздел 3.2.2 «Сравнение эффективности традиционных антибиотиков и ингибитора персистенции клеток *M. smegmatis* в условиях скольжения»). В ходе эксперимента были выбраны следующие концентрации: DMNP — 0,1 МПК, рифампицин — 0,02 МПК (рифампицин очень эффективен в отношении бактерий в экспоненциальной фазе, поэтому его концентрация гораздо ниже, чем у остальных антибиотиков), стрептомицин — 0,1 МПК. Антибиотики вносили в среду вместе с микобактериальной культурой, после чего производили изменения уровней полифосфатов в экспоненциальной стадии (16 часов), ранней и поздней стационарной стадиях (48-72 часа) и начальной стадии отмирания (96 часов). Классические антибиотики, наиболее активные в отношении культур в экспоненциальной фазе роста, должны вызывать стресс и рост уровней полифосфатов на ранних этапах роста микобактерий, в то время как DMNP, эффективный в отношении покоящихся клеток и клеток в стационарной фазе роста [Tkachenko *et al.*, 2021], должен повышать уровни полифосфатов на поздних этапах измерений.

Под воздействием сублетальных концентраций антибиотиков уровни полифосфатов в клетках родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155 изменялись по-разному. Так, стрептомицин вызывал двукратное снижение концентрации PolyP на протяжении всего периода культивирования по сравнению с контролем без антибиотика. DMNP напротив, приводил к увеличению уровня полифосфатов в клетках в 2 раза. В случае рифампицина его действие на концентрацию PolyP проявлялось только в экспоненциальной фазе роста (Рисунок 42).

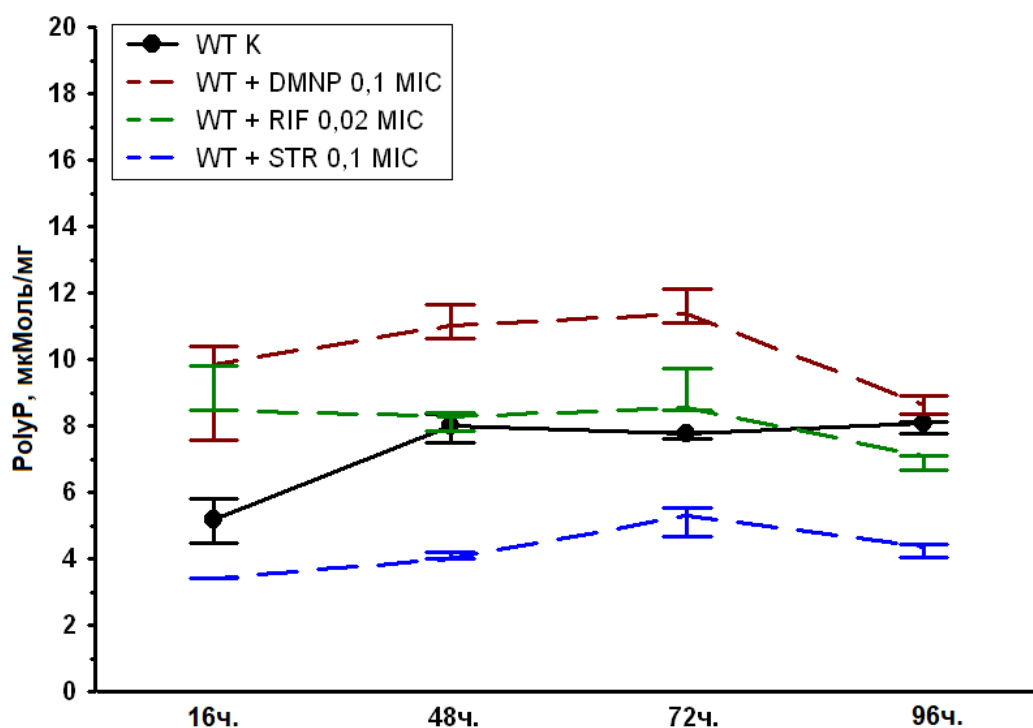


Рисунок 42. Влияние антибиотиков на уровни полифосфатов в клетках штамма *M. smegmatis* mc² 155. PolyP – полифосфаты, RIF – рифампицин, STR – стрептомицин, MIC – минимальная подавляющая концентрация антибиотика.

Штамм с одинарной делецией гена *rel_{Msm}* демонстрировал повышение уровней полифосфатов в присутствии всех исследованных антибиотиков (Рисунок 43). Однако степень влияния различалась. Наибольшее увеличение концентрации полифосфатов наблюдалось под воздействием рифампицина, при этом их уровень продолжал повышаться в течение всего периода измерений. DMNP также способствовал увеличению уровня PolyP, но значительные изменения наблюдались только в экспоненциальной фазе. Через 48 часов роста его эффект становился

статистически незначимым. В случае стрептомицина увеличение концентрации полифосфатов происходило также лишь в экспоненциальной фазе. Однако в стационарной фазе и фазе отмирания уровни полифосфатов в клетках микобактерий снижались ниже контрольных значений.

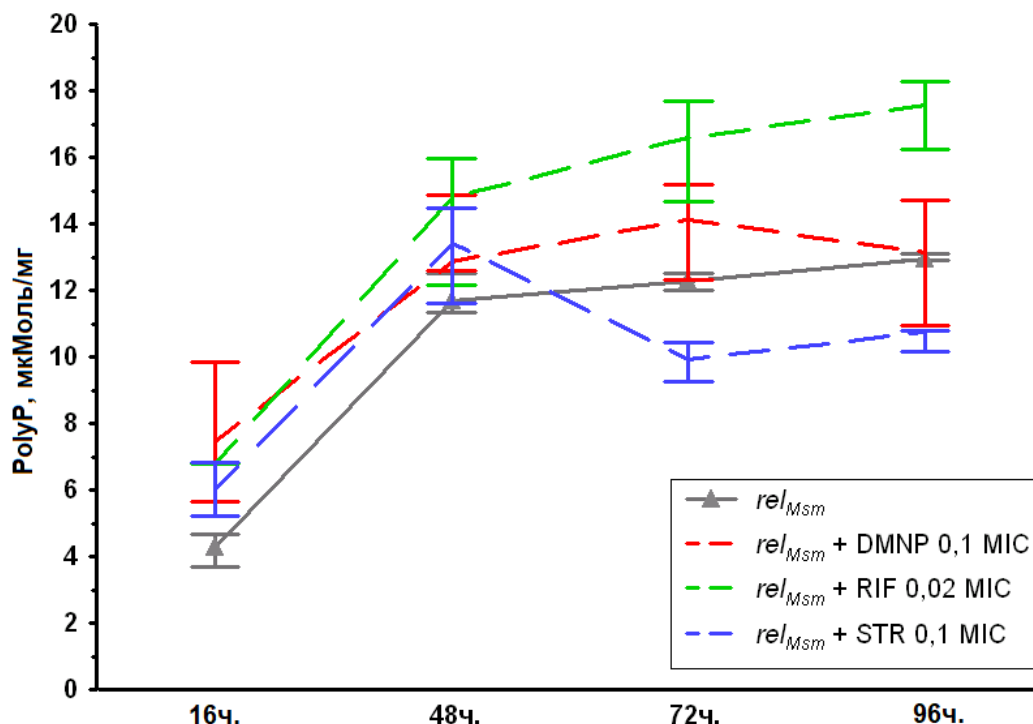


Рисунок 43. Влияние антибиотиков на уровни полифосфатов в клетках штамма *M. smegmatis* mc² 155 Δrel_{Msm} . PolyP – полифосфаты, RIF – рифампицин, STR – стрептомицин, MIC – минимальная подавляющая концентрация антибиотика.

Полученный результат, вероятно, связан с тем, что мутантный штамм с делецией гена демонстрировал более высокую чувствительность к антибиотикам при исследовании биоплёнкообразования и скольжения. Высокие уровни полифосфатов в клетках указывают на стрессовую реакцию, вызванную воздействием антибиотиков, поскольку накопление полифосфатов является следствием активности алармонсинтетаз, подавляющих экзополифосфатазы, а также этапом стринджент-ответа бактерий на стресс, вызванный антибиотиками [Zhai *et al.*, 2023; Qi *et al.*, 2024].

Для бактерий штамма с двойной делецией генов rel_{Msm} и $relZ$ наблюдалась картина аналогичная действию антибиотиков на штамм *M. smegmatis* mc² 155

Δrel_{Msm} . Антибиотики способствовали повышению уровня полифосфатов, однако наиболее выраженный эффект наблюдался на ранних этапах стационарной фазы, примерно через 48 часов после начала культивирования. Действие стрептомицина к этому времени ослабевало, что приводило к снижению концентрации полифосфатов до значений, близких к контрольным. В то же время рифампицин и DMNP одинаково эффективно повышали уровень полифосфатов в клетках микобактерий на протяжении всего периода культивирования (Рисунок 44).

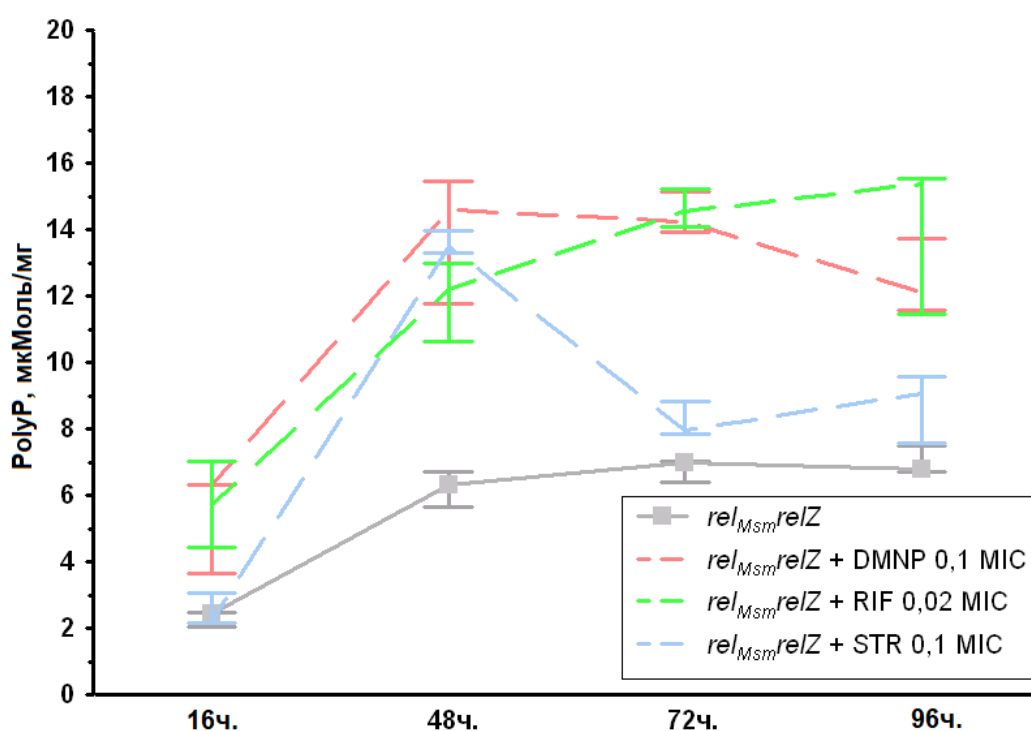


Рисунок 44. Влияние антибиотиков на уровни полифосфатов в клетках штамма *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta rel_Z$. PolyP – полифосфаты, RIF – рифампицин, STR – стрептомицин, MIC – минимальная подавляющая концентрация антибиотика.

Несмотря на то, что в абсолютных значениях концентрации полифосфатов в бактериях с одинарной делецией гена rel_{Msm} превосходили уровни PolyP, обнаруженные в бактериях двух других штаммов, относительно контроля концентрация PolyP сильнее всего возрастала у бактерий штамма $\Delta rel_{Msm} \Delta rel_Z$. Это согласуется с полученными нами данными, что чувствительность к антибиотикам возрастает с увеличением числа делеций генов алармонсинтетаз.

Снижение внутриклеточных концентраций полифосфатов под воздействием стрептомицина в родительском штамме и слабое увеличение PolyP у мутантных штаммов, вероятно, связано с природой данного антибиотика. Стрептомицин воздействует на рибосомальные субъединицы, нарушая процессы трансляции, что затрудняет адаптацию микобактерий к стрессу и объясняет его высокую эффективность.

Для исследования совместного влияния полиаминов и антибиотиков мы использовали те же концентрации, что использовались ранее при измерении влияния этих соединений по отдельности.

Поскольку наиболее сильный эффект из двух полиаминов на микобактерии оказывал спермин, именно этот поликатион был выбран для исследования совместного влияния полиамина и антибиотиков на внутриклеточные концентрации полифосфатов.

Внесение в среду роста микобактерий спермина и антибиотиков одновременно приводило к восстановлению пула внутриклеточных полиаминов на уровне контрольной культуры. Как было показано выше, стрептомицин без спермина значительно снижал уровни PolyP в клетках (Рисунок 42), но в его присутствии, полифосфатов становилось больше, что могло положительно сказываться на адаптации клеток. Однако при совместном воздействии рифампицина или DMNP со спермином концентрации полифосфатов, напротив, снижались, что могло негативно сказываться на выживаемости микроорганизмов (Рисунок 45).

Аналогичные результаты были получены для штамма Δrel_{Msm} . Концентрация полифосфатов в присутствии стрептомицина и спермина увеличивалась после 48 часов культивирования, стремясь к контрольным значениям. Напротив, при воздействии DMNP концентрации PolyP снижались, но также приближались к контрольному уровню. Исключение составлял рифампицин, который в сочетании со спермином вызывал резкое снижение уровня полифосфатов, приходящихся на миллиграмм сухой биомассы (Рисунок 46).

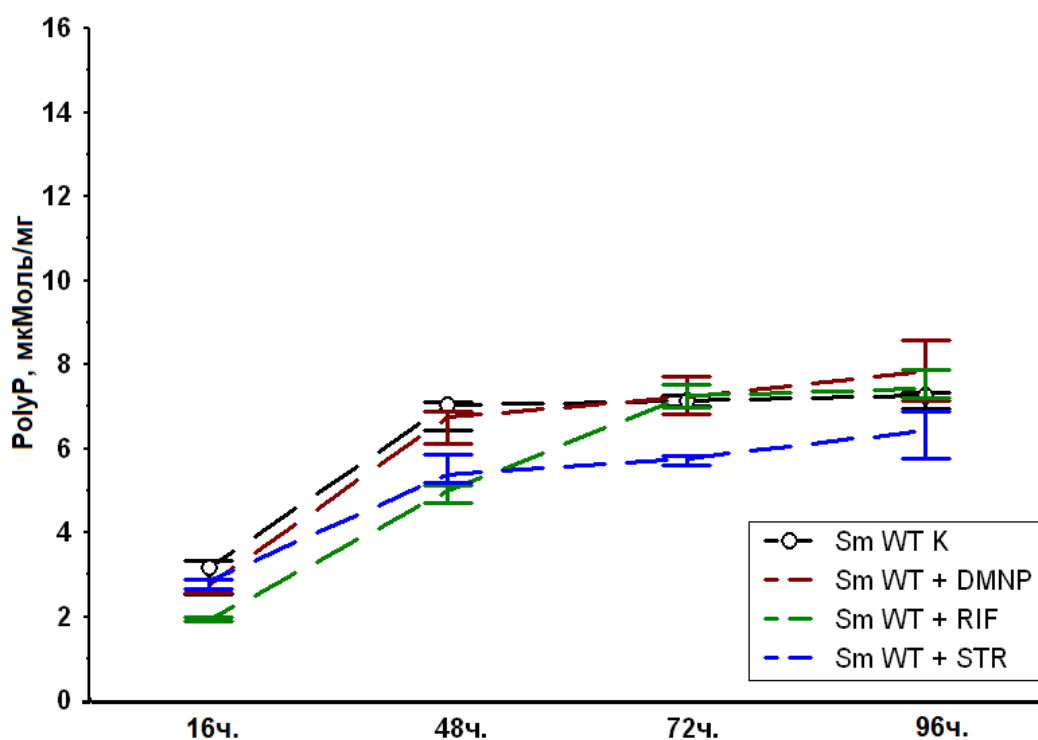


Рисунок 45. Совместное влияние антибиотиков и спермина на уровни полифосфатов в клетках штамма *M. smegmatis* mc² 155. PolyP – полифосфаты, RIF – рифампицин, STR – стрептомицин, MIC – минимальная подавляющая концентрация антибиотика.

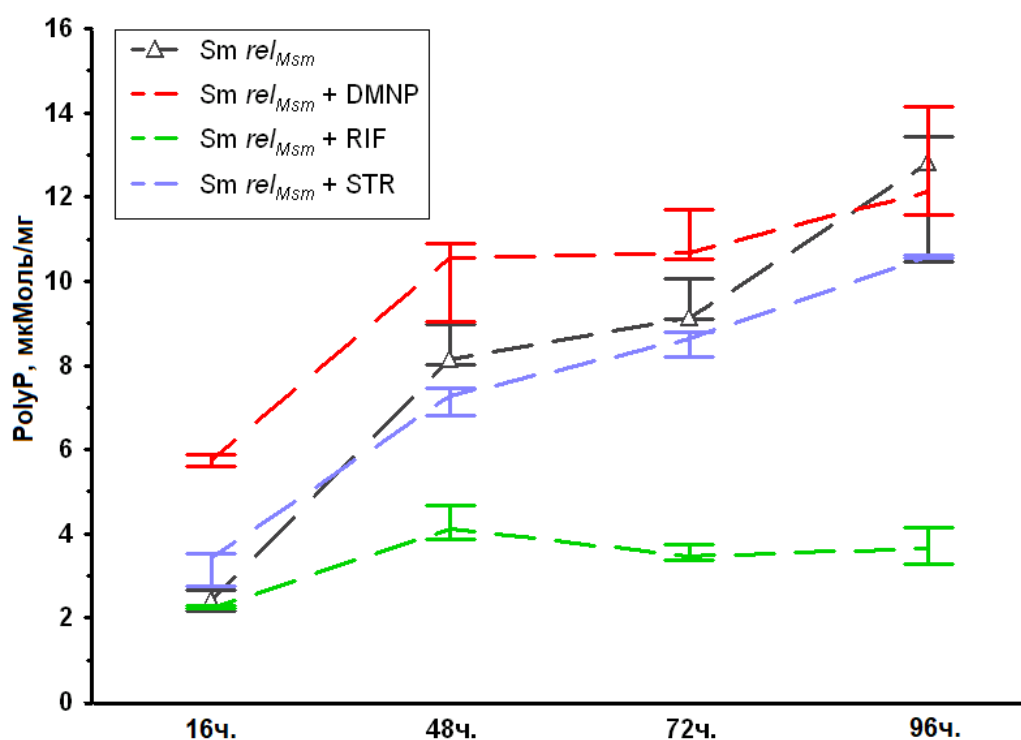


Рисунок 46. Совместное влияние антибиотиков и спермина на уровни полифосфатов в клетках штамма *M. smegmatis* mc² 155 ΔrelMsm. PolyP – полифосфаты, RIF – рифампицин, STR – стрептомицин, MIC – минимальная подавляющая концентрация антибиотика.

Эффект, выявленный при совместном действии спермина и рифампицина на уровень полифосфатов, не отражался в поведении микобактерий при биоплёнкообразовании и скольжении. Тем не менее, снижение концентрации полифосфатов, вызванное спермином, могло усилить чувствительность к данному антибиотику, что отразилось на показателях МКПБ и МБК для данного штамма.

Уровень PolyP в бактериях штамма с двойной делецией генов был наименьшим по сравнению с двумя другими штаммами микобактерий. Тем не менее, присутствие в питательной среде сублетальных концентраций антибиотиков значительно повышало уровни PolyP, что свидетельствует о стрессовом состоянии клеток. Добавление спермина к антибиотикам приводило к обратному эффекту (Рисунок 47). Концентрации полифосфатов снижались, несмотря на наличие антибиотиков в среде. Сильнее всего присутствие спермина оказывало действие на клетки, культивируемые на среде, содержащей рифампицин. Слабее всего спермин действовал на концентрацию полифосфатов в клетках, выросших на среде с DMNP.

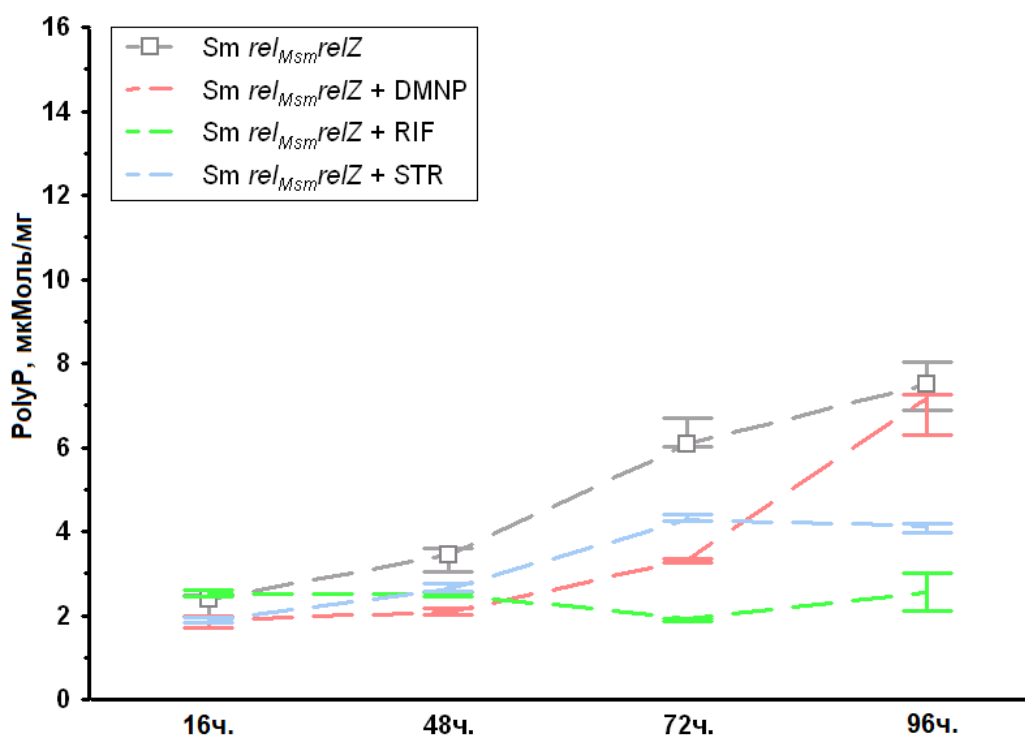


Рисунок 47. Совместное влияние антибиотиков и спермина на уровни полифосфатов в клетках штамма *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$. PolyP – полифосфаты, RIF – рифампицин, STR – стрептомицин, MIC – минимальная подавляющая концентрация антибиотика.

Поскольку ранее было показано, что совместное действие полиаминов и антибиотиков не усиливает адаптационные способности микобактерий (см. раздел 3.4.3 «Влияние полиаминов на эффективность антибиотиков в отношении биоплёночных сообществ микобактерий»), снижение уровня полифосфатов в клетках нельзя объяснить протекторным эффектом спермина. Более того, спермин, снижая уровни полифосфатов, мог препятствовать адаптационным процессам микобактерий, что увеличивало их чувствительность к противомикобактериальным препаратам. В случае стрептомицина, который также способен снижать уровни полифосфатов, внесение спермина, наоборот, поспособствовало их увеличению, что проявлялось в повышении МКПБ и МБК, а также увеличении площади скользящих колоний.

Мишенью стрептомицина, как известно, является рибосомальная 30S субъединица [Biswas, Gorini, 1972]. Поэтому рРНК, обладая отрицательным зарядом, может связываться с положительно заряженными полиаминами. Это взаимодействие может, по-видимому, препятствовать связыванию стрептомицина с рибосомой, что даёт возможность клеткам сохранять нормальный синтез белков, включая полифосфаткиназы, которые участвуют в повышении уровня полифосфатов.

Материалы раздела 3.4 опубликованы в работах:

Zamakhaev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycolicibacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // Int J Mycobacteriol. – 2020. – V. 9. – № 2. – P.138-143.

Nesterova L. Yu., Tsyganov I. V., Tkachenko A. G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2020. – V. 56. – № 4. – P. 387-394.

Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Влияние биогенных полиаминов на скольжение микобактерий в присутствии антибиотиков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26. – № 5. – С. 458-466.

Цыганов И.В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на характер скольжения *Mycobacterium smegmatis* // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2024. – № 4. – С. 401-411.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной диссертационной работе исследовано участие алармонсинтетаз Rel_{Msm} и RelZ в процессах биоплёнкообразования и скольжения *M. smegmatis*, а также их влияние на чувствительность микобактерий к антибактериальным препаратам. При делеции генов алармонсинтетаз микобактерий теряют способность образовывать устойчивые поверхностные биоплёнки: процессе образования, биоплёнки фрагментировались, а затем оседали на дно чашки (Рисунки 5, 7). Нарушение биоплёнкообразования не было вызвано изменением выживаемости микобактерий, поскольку биомассы фрагментов биоплёнки у мутантных штаммов были равны биомассе целой биоплёнки родительского штамма (Рисунок 6). Индукция сверхэкспрессионной плазмиды, содержавшей один из генов, кодирующих алармонсинтетазу, восстанавливала целостность биоплёнки. При этом эффект не зависел от того, ген какой из алармонсинтетаз присутствовал в плазмиде (Рисунок 7). Данный результат подтверждает участие алармонсинтетаз в регуляции персистенции не только через контроль уровней алармонов (p)ppGpp [Эль-Регистан и др., 2014], но и как регулятора биоплёнкообразования. Фрагментация биоплёнок позволяет нарушать среду, в которой поддерживается дефицит питательных веществ и стресс, индуцирующий переход бактерий в состояние персистеров [Lewis, 2010; Эль-Регистан и др., 2014; Николаев и др., 2020].

Интенсивность скольжения у микобактерий зависела также от наличия действующих алармонсинтетаз, но эффект не был пропорционален числу делеций. Штамм с единственной делецией гена алармонсинтетазы *rel_{Msm}* демонстрировал существенно более высокую способность к скольжению. Бактерии родительского штамма без делеций и штамм с двойной делецией генов *rel_{Msm}* и *relZ* практически не отличались по интенсивности скольжения (Рисунок 10). Исследование монослоя скользящих колоний у штаммов подтвердило влияние делеции *rel_{Msm}* непосредственно на процесс скольжения, а не на пролиферацию или выживаемость бактериальных клеток. Бактериальный монослой, формируемый штаммом с

делецией rel_{msm} , был значительно менее плотным, чем у двух других штаммов (Рисунки 8, 38). Таким образом, при равной скорости деления бактерий, колония занимала более значительную площадь, чем колонии родительского штамма и штамма с двойной делецией.

В работе исследована эффективность воздействия на биоплёнкообразование и скольжение микобактерий традиционных противотуберкулезных антибиотиков, стрептомицина и рифампицина, а также проведено сравнение эффективности данных антибиотиков с воздействием ингибитора персистенции DMNP. Результаты этих исследований показали, что стрептомицин демонстрирует высокую эффективность в отношении биоплёночных сообществ микобактерий и планктона (Рисунки 19, 20; Таблица 7), наименьший эффект в отношении биоплёнок оказывает рифампицин (Рисунки 17, 18; Таблица 6), тогда как ингибитор персистенции DMNP проявляет сравнительно высокую эффективность в подавлении формирования биоплёнок микобактерий, но несколько уступает по эффективности стрептомицину (Рисунки 14, 16; Таблица 5). Тем не менее, DMNP демонстрирует наибольшую разницу между концентрацией, ингибирующей образование биоплёнок, и бактерицидной концентрацией. Это указывает на высокую эффективность данного соединения в отношении биоплёночных сообществ, которые являются наиболее распространенной формой существования бактерий в природных условиях [Николаев, Плакунов, 2007], а также являются средой, способствующей образованию персистеров [Эль-Регистан и др., 2014].

Исследование влияния антибиотиков и DMNP на скольжение показало, что рифампицин наиболее эффективно ограничивает скольжение микобактерий (Рисунки 21-24). Пример с влиянием рифампицина на биоплёночные сообщества и на скользящие колонии микобактерий наглядно демонстрирует различия в эффективности этого антибиотика против бактерий в экспоненциальной и стационарной фазах. Влияние стрептомицина и DMNP на скольжение было примерно одинаковым по эффективности. В отличие от этого, следует отметить различия в характере действия перечисленных антибиотиков. Ингибитор персистенции DMNP уже при минимальных концентрациях значительно снижал

площадь колонии, после чего она не изменялась несмотря на дальнейшее повышение концентрации DMNP вплоть до проявления бактерицидного эффекта (Рисунки 21-24). В отличие от этого, концентрационный эффект на площадь скольжения в присутствии других антибиотиков проявлялся во всем диапазоне исследуемых концентраций. Последовательная делеция алармонсинтетаз не влияла на характер действия препаратов – степень уменьшения площадей от их концентрации не менялась. Таким образом, DMNP проявлял наибольший эффект на скольжение, приводя к существенному сокращению площади скользящей колонии уже при минимальных концентрациях. При этом его эффект не зависел от наличия в геноме алармонсинтетаз. Это указывает на то, что DMNP может воздействовать и на другие мишени клетки, включая не идентифицированные алармонсинтетазы [Tkachenko *et al.*, 2021].

Изучена функциональная роль гликопептидолипидов и полифосфатов в формировании биоплёнок и скольжении. Согласно существующей модели скольжения [Recht *et al.*, 2000], наличие ГПЛ является ключевым фактором, обуславливающим перемещение бактерий по гидрофильным поверхностям за счёт увеличения гидрофобности клеточной поверхности. Тем не менее, в ходе экспериментов было установлено, что у бактерий штамма с делецией одного гена алармонсинтетазы *rel_{Msm}*, выявлен дефицит ГПЛ (Рисунок 25), который не только не сопровождался снижением способности к скольжению, но, наоборот, сопровождался усилением способности делеционного штамма к скольжению (Рисунки 9, 10) по сравнению с бактериями родительского штамма с более высоким содержанием ГПЛ. А бактерии штамма с двойной делецией генов *rel_{Msm}* и *relZ* формировали скользящие колонии с той же интенсивностью, что и бактерии родительского штамма, хотя имели существенный дефицит ГПЛ. Существуют и другие исследования, в которых отсутствовала прямая корреляция между продукцией ГПЛ и способностью к скольжению. В недавнем исследовании изменения морфотипа *M. abscessus*, усиление скольжения и формирование более гладкой поверхности колонии не сопровождалось увеличением количества ГПЛ в клеточной оболочке [Liu *et al.*, 2021]. Таким образом, ГПЛ, вероятно, необходимы

для скольжения, но не являются его ключевым фактором, а механизм скольжения микобактерий требует дальнейших исследований. В то же время, уровень ГПЛ коррелировал со способностью образовывать поверхностные биоплёнки. Дефицитные по ГПЛ штаммы-мутанты имели дефекты в биоплёнкообразовании и гидрофильную поверхность (Рисунки 7, 25).

Возрастание образования полифосфатов наблюдалось у микобактерий с делецией гена *rel_{Msm}*, кодирующего «большую» алармонсинтетазу. Делеция обеих алармонсинтетаз способствовала снижению общего уровня полифосфатов в клетках микобактерий на протяжении всех фаз роста (Рисунок 27). В результате этого, уровень полифосфатов в бактериях разных штаммов возрастал в следующем порядке: *M. smegmatis* mc² 155 $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ \rightarrow M. smegmatis mc² 155 $\rightarrow M. smegmatis$ mc² 155 Δrel_{Msm} . Такое распределение уровней полифосфатов среди бактерий разных штаммов даёт возможность предположить о связи между содержанием полифосфатов в клетках и их способностью к скольжению, поскольку штамм с одной делецией алармонсинтетазы скользил значительно лучше двух других штаммов.$

Таким образом, механизм регуляции биоплёнкообразования с участием алармонсинтетаз происходит через контроль ГПЛ и общей гидрофобности поверхности (Рисунок 31). В то же время скольжение микобактерий зависело гораздо меньше от гидрофобности поверхности и содержания ГПЛ, но имело корреляцию с внутриклеточными уровнями полифосфатов, которые, в свою очередь не были жестко связаны с активностью алармонсинтетаз. Результаты проведённых нами исследований свидетельствуют о том, что процесс скольжения микобактерий имеет гораздо более сложную систему регуляции, чем в предложенной ранее модели [Recht *et al.*, 2000] и не ограничивается только характером взаимодействия клетка-поверхность.

При выполнении диссертационной работы изучен регуляторный эффект полиаминов на интенсивность синтеза ГПЛ и полифосфатов, а также их опосредованное воздействие на процессы биоплёнкообразования и скольжения микобактерий. При этом мы ограничились исследованием лишь экзогенного

влияния полиаминов на этот процесс, поскольку, несмотря на наличие в геноме микобактерий генов, кодирующих аргинин декарбоксилазу и агматиназу [Замахаяев и др. 2018], нам не удалось обнаружить полиамины в клетках *M. smegmatis* mc² 155, даже после их культивирования на средах с предшественниками полиаминов аргинином и агматинном (Рисунки 28, 29). Несмотря на то, что гены синтеза полиаминов представлены в генотипе *M. smegmatis* [Замахаяев и др., 2018]. Однако необходимость изучения воздействия на микобактерии экзогенных полиаминов продиктована их присутствием в значительном количестве в тканях организма-хозяина [Igarashi, Kashiwagi, 2010], что, как нами показано в диссертационной работе, может оказать существенное воздействие на уровне взаимодействия микроорганизмы–организм хозяина.

Биогенные полиамины спермидин и спермин, которые вносили в среду культивирования микобактерий, восстанавливали целостность поверхностных биоплёнок у штаммов-мутантов, дефицитных по алармону (p)ppGpp (Рисунок 30). При этом интенсивность действия данных поликатионов была прямо пропорциональна силе их положительного заряда, возрастающего в порядке спермидин→спермин. Исследование влияния полиаминов на степень гидрофобности бактериальной поверхности показало их статистически значимый положительный эффект, который возрастал пропорционально заряду полиаминов (Рисунок 31 В). Возрастание гидрофобности было связано с частичным восстановлением уровней ГПЛ в клеточной стенке микобактерий (Рисунки 32, 33). Таким образом, присутствие ГПЛ в клеточной оболочке действительно влияет на гидрофобность клеточной поверхности. Увеличение количества ГПЛ на внешней поверхности клеток участвует в обеспечении устойчивости и целостности поверхностной биоплёнки микобактерий, а также сохраняет её биомассу, что приводит к увеличению массы биоплёнки относительно контроля, выращенного на среде в отсутствие полиаминов (Рисунок 31). Следует отметить, что восстановление биоплёнки и увеличение её биомассы в присутствии полиаминов не способствовало выживаемости при воздействии антибиотиков. Более того, спермин повышал чувствительность всех исследованных штаммов к рифампицину

и DMNP, снижая минимальную концентрацию, подавляющую биоплёнкообразование (Таблица 8). Только стрептомицин становился менее эффективен в отношении биоплёнок в присутствии спермина (Таблица 10).

В то же время, полиамины разнонаправленно влияли на скольжение. При этом спермидин способствовал скольжению, а спермин наоборот, уменьшал площади скользящих колоний (Рисунки 36, 37). Учитывая тот факт, что полиамин спермин способствовал накоплению ГПЛ (Рисунок 32), это подтверждает полученные нами данные, противоречащие общепринятой модели скольжения [Recht *et al.*, 2000]. Исходя из этого, складывается представление, что гидрофобность, модулируемая полиаминами посредством изменения содержания ГПЛ, не является ключевым фактором, определяющим скольжение.

Изменения в содержании полифосфатов при добавлении в среду полиаминов не коррелировали с изменением площадей скользящих колоний. При этом спермидин и спермин снижали уровни полифосфатов, особенно на стадии активного роста бактериальных культур (Рисунки 40, 41), то есть действовали однонаправленно, в то время как модуляция скольжения происходила разнонаправленно и зависела от конкретного поликатиона (Рисунки 36, 37). Уменьшение уровней полифосфатов, вызванное добавлением полиаминов в среду роста микобактерий, подвергшимся стрессовому воздействию антибиотиков, коррелировало с изменением МКПБ и МБК микобактерий (Таблицы 8-10). При этом снижение уровней полифосфатов в клетках, подвергшихся воздействию DMNP и рифампицина в присутствии спермина, приводило к снижению общей резистентности бактерий (Рисунок 45) и уменьшению показателей МБК и МКПБ антибиотиков (Таблицы 8, 9). При воздействии на клетки сублетальных концентраций стрептомицина, не вызывающих гибель клеток, уровень полифосфатов резко снижался (Рисунки 42-44), что, вероятно, связано с изменением его мишени (30S субъединица рибосомы) и процесса трансляции в целом. При добавлении к таким клеткам спермина, уровень полифосфатов возрастал и стремился к норме (Рисунки 45-47), что приводило к повышению выживаемости биоплёнок и увеличению значений МБК и МКПБ.

Основываясь на полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что вновь синтезированный ингибитор персистенции DMNP, как один из трёх исследованных нами антибиотиков, способен статистически значимо подавлять биоплёнкообразование и скольжение микобактерий, не уступая или даже превосходя классические антимикобактериальные антибиотики. Дополнительным преимуществом DMNP является усиление антибактериальных свойств в присутствии биогенных полиаминов спермидина и спермина. DMNP наиболее эффективен в отношении клеток, включая персисторы, пребывающих в стационарной фазе роста. В этом случае он может эффективно дополнять действие рифампицина – антибиотика, который хорошо действует против активно делящихся микобактерий, но малоэффективен в отношении биоплёнок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование посвящено изучению связи между основными регуляторами стресса микобактерий (алармонсинтетазами Rel_{Msm} и RelZ) и процессами биоплёнкообразования и скольжения микобактерий, которые способствуют адаптации к стрессам внешней среды. С использованием данного подхода проведена сравнительная характеристика эффективности недавно синтезированного ингибитора персистенции DMNP и двух общепринятых противомикобактериальных антибиотиков – рифампицина и стрептомицина – в отношении бактерий в составе таких сообществ как биоплёнки и скользящие колонии *M. smegmatis*. Действие антибиотиков исследовали как отдельно, так и в комплексе с биогенными полиаминами – распространёнными формами регуляторов метаболизма, присутствующими практически во всех формах живых организмов. В диссертационной работе описана связь между наличием генов алармонсинтетаз и количеством гликопептидолипидов в клеточной оболочке микобактерий, которое, в свою очередь, обеспечивает необходимые физические свойства для образования поверхностных биоплёнок. Показана роль полиаминов в регуляции свойств микобактериальной оболочки и их влияние на биоплёнкообразование и антибактериальную эффективность DMNP в сравнении с классическими антибиотиками в отношении биоплёнок.

На основании полученных нами экспериментальных данных показано отсутствие прямой связи между скольжением микобактерий и гидрофобностью их поверхности, что ставит под сомнение текущее представление о механизме скольжения микобактерий [Recht *et al.*, 2000]. В то же время нами обнаружена положительная корреляция между внутриклеточными уровнями полифосфатов и скоростью скольжения. Результаты исследования роли ГПЛ и полифосфатов в процессе скольжения показывают, что реальный механизм скольжения является сложной системой, находящейся под контролем регуляторных процессов, которые исследованы в данной работе и в перспективе будут детализированы.

Результаты оценки воздействия вновь синтезированного ингибитора персистенции DMNP на процессы формирования биоплёнок и скольжения микобактериальных клеток в сравнении с классическими противомикобактериальными антибиотиками показывают его высокую эффективность. Ингибитор персистенции DMNP, способный подавлять ферментативную активность алармонсинтетаз, по результатам диссертационной работы можно отнести к категории эффективных средств борьбы с микобактериальными биоплёнками. Его использование для лечения бактериальных инфекций в перспективе будет способствовать повышению эффективности традиционных антибиотиков, которые демонстрируют слабую активность в отношении бактерий в составе биоплёнок таких как рифампицин, но эффективный против активно растущих микобактерий.

Ещё одним преимуществом DMNP является показанная в данной диссертационной работе способность к повышению антибактериальной активности в присутствии биогенных полиаминов – поликатионов, встречающихся в клетках и тканях большинства организмов. Это свойство DMNP усиливает также его преимущество над стрептомицином, эффективность которого снижается в присутствии полиаминов.

Продолжение исследований на данную тему может быть связано с несколькими основными направлениями:

1. Исследование активности DMNP в отношении других видов микобактерий-возбудителей микобактериозов.
2. Определение реального механизма микобактериального скольжения и изучение связи между адаптацией микобактерий к стрессу и скольжением.
3. Поиск других соединений, способных подавлять активность алармонсинтетаз и поиск подобной активности у уже существующих антибиотиков.
4. Более детальное исследование механизма влияния полиаминов на активность ингибитора персистенции DMNP в отношении микобактериальных биоплёнок.

ВЫВОДЫ

1. Совокупная роль алармонсинтетаз Rel_{Msm} и RelZ в процессе биоплёнкообразования и скольжения *M. smegmatis* заключается в сохранении целостности поверхностных биоплёнок (пелликул) и повышении толерантности бактерий к антибиотикам. В то же время, большая алармонсинтетазы Rel_{Msm}, обладающая, наряду с синтетазной, алармонгидролазной активностью, оказывает сдерживающий регуляторный эффект на скольжение микобактерий без изменения скорости их пролиферации.
2. Существенная роль в поддержании количества гликопептидолипидов в составе клеточной оболочки и, соответственно, гидрофобности поверхности микобактерий, принадлежит алармонсинтезам, делеция которых вызывает фрагментацию биоплёнок. В отличие от этого, скольжение не зависит от содержания ГПЛ, но прямо коррелирует с уровнем полифосфатов.
3. Полиамины – спермидин и спермин – способствуют восстановлению нарушенного антибиотиками уровня поверхностных гликопептидолипидов микобактерий, что положительно влияет на величину их гидрофобности и, как следствие, усиливает образование биоплёнок и их толерантность к стрептомицину. В то же время, полиамины повышают ингибирующий эффект DMNP на формирование биоплёнок микобактерий и их способность образовывать полифосфаты. Полиамины оказывают разнонаправленное воздействие на способность микобактерий к скольжению: спермидин способствует его усилению, а спермин вызывает обратный эффект.
4. Показана высокая эффективность DMNP как ингибитора, действующего одновременно на обе изученные нами адаптивные реакции коллективного взаимодействия микобактерий: биоплёнкообразование и скольжение. Это выгодно отличает его от традиционных антибиотиков (рифампицина и стрептомицина), демонстрировавших эффективное подавление только одной из них. Впервые продемонстрирована положительная роль спермина в усилении подавляющего эффекта DMNP на микобактериальные биоплёнки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
GPL – гликопептидолипиды
МБК – минимальная бактерицидная концентрация
МКПБ – минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование
МЛУ-ТБ – множественная лекарственная устойчивость к туберкулезу
ОБП – образование биоплёнок
ОП – оптическая плотность
П/Т – противотуберкулезные (антибиотики)
РРК – полифосфаткиназа
ТСХ – тонкослойная хроматография
ЭПС – экзополисахариды
РРХ – экзополифосфатазы
с-di-GMP – циклический дигуанилат
DAPI – диамидино фенилиндол
DMNP – 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановая кислота
In vivo – внутри живого организма
(p)ppGpp – гуанозин пента- тетрафосфат
PolyP – полифосфаты

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Роль биосинтеза кадаверина в адаптации *Escherichia coli* к действию пероксида водорода // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58. – № 5. – С. 467-475.
2. Веслополова Е.Ф. Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов // Микробиология. – 1995. – Т. 64. – № 2. – С. 279-284.
3. Жгун А. А. Влияние полиаминов на биосинтез антибиотика цефалоспорины в штаммах *Acremonium chrysogenum* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2015. – № 3. – С. 47-54.
4. Замахаев М. В., Григоров А. С., Капрельянц А. С., Шумков М. С. *Mycobacterium smegmatis* обладает активными генами метаболизма полиаминов // Вестник Пермского университета. Биология. – 2018. – № 3. – С. 284-290.
5. Нестерова Л. Ю., Цыганов И. В., Ткаченко А. Г. Биогенные полиамины влияют на антибиотикочувствительность и поверхностные свойства клеток *Mycobacterium smegmatis* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 4. С. 342-351
6. Нестерова Л.Ю., Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Роль биогенных полиаминов в регуляции скольжения у микобактерий // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2017. – № 3. – С. 304-310.
7. Николаев Ю. А., Плакунов В. К., Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 2. – С. 149-163.
8. Николаев Ю. А., Панкратов Т. А., Ганнесен А. В., Колганова Т.В., Сузина Н.Е., Демкина Е.В., Эль-Регистан Г.И. Образование и свойства клеток-персистеров бактерий – обитателей кожи человека, *Staphylococcus capitis* и *Staphylococcus epidermidis* // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 4. – С. 432-443.
9. Сизова Ю. В. Роль полиамина кадаверина в адаптации холерных вибрионов к стрессу в условиях изменяющейся газовой среды // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы. – 2014. – С. 142.
10. Ткаченко А.Г., Нестерова Л.Ю. Полиамины как модуляторы экспрессии генов окислительного стресса у *Escherichia coli* // Биохимия. – 2003. – Т. 68. – № 8. – С. 1040-1048.
11. Ткаченко А.Г., Пшеничных М.Р., Салахетдинова О.Я. Роль транспорта путресцина и калия в регуляции топологического состояния ДНК в процессе адаптации *Escherichia coli* к температурному стрессу // Микробиология. – 1998. – Т. 67. – № 5. – С. 601-606.
12. Ткаченко А.Г., Пшеничных М.Р., Салахетдинова О.Я., Нестерова Л.Ю. Роль путресцина и энергетического состояния *Escherichia coli* в регуляции топологии ДНК при адаптации к окислительному стрессу // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – С. 27-32.
13. Ткаченко А.Г., Пшеничных М.Р., Салахетдинова О.Я., Нестерова Л.Ю. Роль транспорта путресцина и калия в регуляции топологического состояния ДНК в

процессе адаптации *Escherichia coli* к температурному стрессу // Микробиология. – 1998. – Т. 67. – С. 601-606.

14. Ткаченко А.Г., Салахетдинова О.Я., Пшеничнов М.Р. Роль транспорта путресцина и калия в адаптации *Escherichia coli* к голоданию по аммоний // Микробиология – 1996. – Т. 66. – С. 740-744.

15. Ткаченко А.Г., Салахетдинова О.Я., Пшеничнов М.Р. Обмен путресцина и калия между клеткой и средой как фактор адаптации *Escherichia coli* к гиперосмотическому шоку // Микробиология. – 1997. – Т. 4. – № 3. – С. 329-334.

16. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от силы стрессорных воздействий супероксидных радикалов // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – № 1. – С. 128-136.

17. Ткаченко, А. Г. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – № 2. – С. 110-133.

18. Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Влияние биогенных полиаминов на скольжение микобактерий в присутствии антибиотиков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26. – № 5. – С. 458-466.

19. Цыганов И.В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на характер скольжения *Mycobacterium smegmatis* // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2024. – № 4. – С. 401-411.

20. Шлегель Г. Общая микробиология. – Москва: Рипол-Классик. – 1972. – 567 с.

21. Эль-Регистан Г.И., Николаев Ю. А., Мулюкин А. Л., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Писарев В.М., Гапонов А.М., Тутельян А. В. Явление персистенции – формы и механизмы выживаемости популяций // Медицинский алфавит. – 2014. – Т. 2. – № 10. – С. 49-54.

22. Achbergerova L., Nahalka J. Polyphosphate--an ancient energy source and active metabolic regulator // Microb Cell Fact. – 2011. – V. 10. – P. 63.

23. Adjemian J., Olivier K.N., Seitz A.E., Holland S.M., Prevots D.R. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries // Am J Respir Crit Care Med. – 2012. – V. 185. – P. 881-886.

24. Agustí G., Astola O., Rodríguez-Güell E., Julián E., Luquin M. Surface spreading motility shown by a group of phylogenetically related, rapidly growing pigmented mycobacteria suggests that motility is a common property of mycobacterial species but is restricted to smooth colonies // J Bacteriol. – 2008. – V. 190. – № 20. – P. 6894-6902.

25. Ahn K., Kornberg A. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate // J Biol Chem. – 1990 – V. 265. – № 20. – P. 11734-11739.

26. Aksoy M., Pootakham W., Grossman A. R. Critical function of a *Chlamydomonas reinhardtii* putative polyphosphate polymerase subunit during nutrient deprivation // Plant Cell. – 2014. – V. 26. – P. 4214-4229.

27. Albi T., Serrano A. Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2016. – V. 32. – № 2. – P.27.
28. Aschar-Sobbi R., Abramov A.Y., Diao C., Kargacin M.E., Kargacin G.J., French R.J., Pavlov E. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach // *J Fluoresc.* – 2008. – V. 18. – № 5. – P. 859-866.
29. Ault-Riché D., Fraley C.D., Tzeng C.M., Kornberg A. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* – 1998. – V. 180. – №7. – P. 1841-1847.
30. Bachmann N.L., Salamzade R., Manson A.L., Whittington R., Sintchenko V., Earl A.M., Marais B.J. Key Transitions in the Evolution of Rapid and Slow Growing Mycobacteria Identified by Comparative Genomics // *Front Microbiol.* – 2020. – V. 21. – №10. – P. 3019.
31. Bachrach U., Persky S., Razin S. Metabolism of amines. 2. The oxidation of natural polyamines by *Mycobacterium smegmatis* // *Biochemical journal.* – 1960. – V. 76. – P. 306-310.
32. Baijal K. Downey M. The promises of lysine polyphosphorylation as a regulatory modification in mammals are tempered by conceptual and technical challenges // *BioEssays.* – 2021. – V. 43. – P. 2100058.
33. Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.M., Hardt W.D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.W., Tenson T., Van Melder L., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // *Nat Rev Microbiol.* – 2019. – V. 7. – P.441-448.
34. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment// *Nat Rev Microbiol.* 2016. – V. 14. – P. 320-330.
35. Besra G.S., Khoo K.H., McNeil M. R., Dell A., Morris H. R. Brennan P.J. A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – P. 4257-4266.
36. Bigger, J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation // *Lancet.* – 1944. – V. 244. – P. 497-500.
37. Biswas D.K., Gorini L. The attachment site of streptomycin to the 30S ribosomal subunit // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1972. – V. 69. – № 8. – P. 2141-2144.
38. Bowlin M.Q., Gray M.J. Inorganic polyphosphate in host and microbe biology // *Trends Microbiol.* – 2021. – V. 29. – № 11. – P. 1013-1023.
39. Branda S. S., Vik Å., Friedman L., & Kolter R. Biofilms: the matrix revisited // *Trends in Microbiology.* – 2005. – V. 13. – № 1. – P. 20-26.
40. Brennan P.J., Nikaido H. The envelope of mycobacteria // *Annu Rev Biochem.* – 1995. – V. 64. – P. 29-63.

41. Candon H.L., Allan B.J., Fraley C.D., Gaynor E.C. Polyphosphate kinase 1 is a pathogenesis determinant in *Campylobacter jejuni* // J Bacteriol. – 2007. – V. 189. – № 22. – P. 8099-8108.
42. Cardile A.P., Woodbury R.L., Sanchez C.J. Jr, Becerra S.C., Garcia R.A., Mende K., Wenke J.C., Akers K.S. Activity of Norspermidine on Bacterial Biofilms of Multidrug-Resistant Clinical Isolates Associated with Persistent Extremity Wound Infections // Adv Exp Med Biol. – 2017. – V. 973. – P. 53-70.
43. 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.
44. Chakraborty P., Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections // Microb Cell. – 2019. – V. 6. – № 2. – P. 105-122.
45. Chaturvedi R., Asim M., Hoge S., Lewis N.D., Singh K., Barry D.P., de Sablet T., Piazzuelo M.B., Sarvaria A.R., Cheng Y., Closs E.I., Casero R.A. Jr, Gobert A.P., Wilson K.T. Polyamines Impair Immunity to *Helicobacter pylori* by Inhibiting L-Arginine Uptake Required for Nitric Oxide Production // Gastroenterology. – 2010. – V. 139. – № 5. – P. 1686-1698.
46. Conlon B.P., Rowe S.E., Lewis K. Persister cells in biofilm associated infections // Adv. Exp. Med. Biol. – 2015. – V. 831. – P. 1-9.
47. Corona-Izquierdo F.P. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth // FEMS Microbiol. Let. – 2002. – V. 211. – P. 105-110.
48. Daffé M., Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity // Adv Microb Physiol. – 1997. – V. 39. – P. 131-203.
49. Danchik C., Wang S., Karakousis P.C. Targeting the *Mycobacterium tuberculosis* Stringent Response as a Strategy for Shortening Tuberculosis Treatment // Front Microbiol. – 2021. – V. 12. – P. 744167.
50. DePas W.H., Bergkessel M., Newman D.K. Aggregation of Nontuberculous Mycobacteria Is Regulated by Carbon-Nitrogen Balance // mBio. – 2019. – V. 10. – № 4. – P. e01715-19.
51. Diaz J.M., Ingall E.D. Fluorometric quantification of natural inorganic polyphosphate // Environ Sci Technol. – 2010. – V.44. – № 12. – P. 4665-4671.
52. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces // Emerg Infect Dis. – 2002. – V. 8. – № 9. – P. 881-890.
53. Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli* // PLoS Biol. – 2010. – V. 8. – № 2. – P. e1000317.
54. Evans L.V. Biofilms: recent advances in their study and control. 1. – CRC Press: – 2003. – 468 p.
55. Fall R., Kearns D.B., Nguyen T. A defined medium to investigate sliding motility in a *Bacillus subtilis* flagella-less mutant // BMC Microbiology. – 2006. – V. 6. – P. 31.
56. Faria S., Joao I., Jordao L. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection // Journal of pathogens. – 2015. – V. 2015. – P. 809014.

57. Fennelly K.P., Ojano-Dirain C., Yang Q., Liu L., Lu L., Progulske-Fox A., Wang G.P., Antonelli P., Schultz G. Biofilm Formation by *Mycobacterium abscessus* in a Lung Cavity // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2016. – V. 193. – № 6. – P. 692-693.
58. Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life // *Nat Rev Microbiol.* – 2016. – V. 14. – № 9. – P. 563-575.
59. Friedman L., Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 51. – P. 675-690.
60. Gage D.J., Margolin W. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia // *Curr Opin Microbiol.* – 2000. – V. 3. – № 6. – P. 613-617.
61. Gambino M., Cappitelli F. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress // *Biofouling.* – 2016. – V. 32. – № 2. – P. 167-178.
62. Garrison, A.T., Huigens, R.W. Eradicating bacterial biofilms with natural products and their inspired analogues that operate through unique mechanisms // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2017. – V. 17. – P. 1-11.
63. Gefen O., Fridman O., Ronin I., Balaban N.Q. Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2014. – V. 111. – P. 556–561.
64. Gelens L., Hill L., Vandervelde A., Danckaert J., Loris R. A general model for toxin-antitoxin module dynamics can explain persister cell formation in *E. coli* // *PLoS Comput Biol.* – 2013 – V. 9. – № 8. – P. e1003190.
65. Gerdes K, Maisonneuve E. Bacterial persistence and toxin– antitoxin loci // *Annu Rev Microbiol.* – 2012. – V. 66. – P. 103-123.
66. Gomes-Vieira A.L., Wideman J.G., Paes-Vieira L., Gomes S.L., Richards T.A., and Meyer-Fernandes J.R. Evolutionary conservation of a core fungal phosphate homeostasis pathway coupled to development in *Blastocladiella emersonii* // *Fungal Genet. Biol.* – 2018. – V. 115. – P. 20-32.
67. Grau R.R., de Oña P., Kunert M., Leñini C., Gallegos-Monterrosa R., Mhatre E., Vileta D., Donato V., Hölscher T., Boland W., Kuipers O. P., Kovács Á. T. A Duo of Potassium-Responsive Histidine Kinases Govern the Multicellular Destiny of *Bacillus subtilis* // *mBio.* – 2015. – V. 6. – № 4. – P. e00581.
68. Gray M.J. Inorganic Polyphosphate Accumulation in *Escherichia coli* Is Regulated by DksA but Not by (p)ppGpp // *J Bacteriol* – 2019. – V. 201. – № 9. – P. e00664-00618.
69. Gray M.J., Wholey W.Y., Wagner N.O., Cremers C.M., Mueller-Schickert A., Hock N.T., Krieger A.G., Smith E.M., Bender R.A., Bardwell J.C., Jakob U. Polyphosphate is a primordial chaperone // *Mol Cell.* – 2014. – V. 53. – № 5. – P. 689-699.
70. Gross M.H., Konieczny I. Polyphosphate induces the proteolysis of ADP-bound fraction of initiator to inhibit DNA replication initiation upon stress in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – № 10. – P. 5457-5466.
71. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools // *Clin. Chim. Acta.* – 2004. – V. 34. – № 1-2. – P. 23-35.
72. Gupta K.R., Baloni P., Indi S.S., Chatterji D. Regulation of Growth, Cell Shape, Cell Division, and Gene Expression by Second Messengers (p)ppGpp and Cyclic Di-

- GMP in *Mycobacterium smegmatis* // J Bacteriol. – 2016. – V. 198. – № 9. – P. 1414-1422.
73. Gupta R.S., Lo B., Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera // Front Microbiol. – 2018 – V. 9. – P. 67.
 74. Hammar M, Bian Z, Normark S. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli* // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1996. – V. 93. – №13. – P. 6562-6566.
 75. Hasan C.M., Pottenger S., Green A.E., Cox A.A., White J.S., Jones T., Winstanley C., Kadioglu A., Wright M.H., Neill D.R., Fothergill J.L. *Pseudomonas aeruginosa* utilizes the host-derived polyamine spermidine to facilitate antimicrobial tolerance // JCI Insight. – 2022 – V. 7. – № 22. – P. e158879.
 76. Haworth C.S., Banks J., Capstick T., Fisher A.J., Gorsuch T., Laurenson I.F., Leitch A., Loebinger M.R., Milburn H.J., Nightingale M., Ormerod P., Shingadia D., Smith D., Whitehead N., Wilson R., Floto R.A. British Thoracic Society guidelines for the management of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTMPD) // Thorax. – 2017. – V. 72. – P. 1-64.
 77. Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification // Bacteriol Rev. – 1972. – V. 36. – № 4. – P. 478-503.
 78. Hölscher T., Kovács Á. T. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor // Environ Microbiol. – 2017. – V. 19. – № 7. – P. 2537-2545.
 79. Hong Y., Zhou X., Fang H., Yu D., Li C., Sun B. Cyclic di-GMP mediates *Mycobacterium tuberculosis* dormancy and pathogenicity // Tuberculosis (Edinburgh). – 2013. – V. 93. – P. 625201-625634.
 80. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines // Int J Biochem Cell Biol. – 2010. – V. 42. – № 1. – P. 39-51.
 81. Igarashi K., Kashiwagi K. Effects of polyamines on protein synthesis and growth of *Escherichia coli* // J Biol Chem. – 2018. – V. 93. – P. 18702-18709.
 82. Incerti-Pradillos, C.A., Kabeshov, M.A., O'Hara, P.S., Shipilovskikh, S.A., Rubtsov, A.E., Drobkova, V.A., Balandina, S.Y., and Malkov, A.V. Asymmetric total synthesis of (-)-Erogorgiaene and its C-11 epimer and investigation of their antimycobacterial activity // Chemistry. – 2016. – V. 22. – P. 14390-14396.
 83. Ishige K., Zhang H., Kornberg A. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP // Proc Natl Acad Sci USA. – 2002. – V. 99. – № 26. – P. 16684-16688.
 84. Jain A., Tyagi A. K. Role of polyamines in the synthesis of RNA in mycobacteria // Mol Cell Biochem. – 1987. – V. 78. – P. 3-8.
 85. Jelsbak L., Thomsen L.E., Wallrodt I., Jensen P.R., Olsen J.E. Polyamines are required for virulence in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* // PLoS One. – 2012. – V. 7. – № 4. – P. e36149.
 86. Joana G. Lopes, Sourjik V. Chemotaxis of *Escherichia coli* to major hormones and polyamines present in human gut // The ISME journal. – 2018. – V. 12. – P. 2736-2747.

87. Johnston D.E., McClure W.R. Abortive initiation of in vitro RNA synthesis on bacteriophage λ DNA // Cold Spring Harbor Monograph Archive. – 1976. – V. 6. – P. 413-428.
88. Jung I.L., Kim I.G. Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂ oxidative damage // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – V. 301. – № 4. – P. 915-922.
89. Karlson A.G. The in vitro activity of Ethambutol (Dextro-2, 2'-[Ethylenediimino]-di-l-butanol) against tubercle bacilli and other microorganisms // Am Rev Respir Dis. – 1961. – V. 84. – № 6. – P. 905-906.
90. Kayumov A.R., Khakimullina E.N., Sharafutdinov I.S., Trizna E.Y., Latypova L.Z., Thi Lien H., Margulis A.B., Bogachev M.I., Kurbangalieva A.R. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones // J Antibiot (Tokyo). – 2015. – V. 68. – № 5. – P. 297-301.
91. Kayumov A.R., Nureeva A.A., Trizna E.Y., Gazizova G.R., Bogachev M.I., Shtyrlin N.V., Pugachev M.V., Sapozhnikov S.V., Shtyrlin Y.G. New Derivatives of Pyridoxine Exhibit High Antibacterial Activity against Biofilm-Embedded *Staphylococcus Cells* // Biomed Res Int. – 2015. – V. 2015. – P. 890968.
92. Kearns D.B. A field guide to bacterial swarming motility // Nat Rev Microbiol. – 2010. – V. 8. – № 9. – P. 634-644.
93. Kerns P.W., Ackhart D.F., Basaraba R.J., Leid J.G., Shirtliff M.E. *Mycobacterium tuberculosis* pellicles express unique proteins recognized by the host humoral response // Pathog Dis. – 2014. – V. 70. – № 3. – P. 347-358.
94. Kim W., Killam T., Sood V., Surette M.G. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* results in elevated resistance to multiple antibiotics // J Bacteriol. – 2003. – V. 185. – № 10. – P. 3111-3117.
95. Kinsinger R.F., Shirk M.C., Fall R. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion // J Bacteriol. – 2003. – V. 185. – № 18. – P. 5627-5631.
96. Kobayashi K., Kanesaki Y., Yoshikawa H. Genetic Analysis of Collective Motility of *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 // PLOS Genetics. – 2016. – V. 12. – № 10. – P. e1006387.
97. Kornberg A., Rao N.N., Ault-Riché D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions // Annu Rev Biochem. – 1999. – V. 68. – P. 89-125.
98. Kuchma S.L., Brothers K.M., Merritt J.H., Liberati N.T., Ausubel F.M., O'Toole G.A. BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA1 // J Bacteriol. – 2007. – V. 189. – № 2. – P. 8165-8178.
99. Kulakovskaya T. Pavlov E. Dedkova E.N. Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells // Springer International Publishing: Cham, Switzerland. – 2016. – 243 p.
100. Kumar A., Deshane J.S., Crossman D.K., Bolisetty S., Yan B.S., Kramnik I., Agarwal A., Steyn A.J. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon // J Biol Chem. – 2008. – V. 283. – № 26. – P. 18032-18039.

101. Kuroda A. A polyphosphate-lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2006. – V. 70. – № 2. – P. 325–31.
102. Kwak N., Park J., Kim E., Lee C.H., Han S.K., Yim J.J. Treatment outcomes of mycobacterium avium complex lung disease: a systematic review and meta-analysis // *Clin Infect Dis.* – 2017. – V. 65. – P. 1077–1084.
103. Lam P.K., Griffith D.E., Aksamit T.R., Ruoss S.J., Garay S.M., Daley C.L., Catanzaro A. Factors related to response to intermittent treatment of Mycobacterium avium complex lung disease // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2006. – V. 173. – P. 1283–1289.
104. Lee B.Y., Kim S., Hong Y., Lee S.D., Kim W.S., Kim D.S., Shim T.S., Jo K.W. Risk factors for recurrence after successful treatment of Mycobacterium avium complex lung disease // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – V. 59. – P. 2972–2977.
105. Lewis K. Persister cells // *The Ann Rev of Microbiol.* – 2010. – V. 64. – P. 357–372.
106. Li B., Maezato Y., Kim S.H., Kurihara S., Liang J., Michael A.J. Polyamine-independent growth and biofilm formation, and functional spermidine/spermine N-acetyltransferases in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* // *Mol Microbiol.* – 2019. – V. 111. – № 1. – P. 159–175.
107. Li W., He Z.G. LtmA, a novel cyclic di-GMP-responsive activator, broadly regulates the expression of lipid transport and metabolism genes in *Mycobacterium smegmatis* // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – № 22. – P. 11292–11307.
108. Liu J., Zeinert R., Francis L., Chien P. Lon recognition of the replication initiator DnaA requires a bipartite degron // *Mol Microbiol.* – 2019. – V. 111. – № 1. – P. 176–186.
109. Liu J., Barry C. E. III, Besra G. S. Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall // *J Biol Chem.* – 1996. – V. 271. – P. 29545–29551.
110. Liu T.Y., Tsai S.H., Chen J.W., Wang Y.C., Hu S.T., Chen Y.Y. Mab_3083c Is a Homologue of RNase J and Plays a Role in Colony Morphotype, Aggregation, and Sliding Motility of *Mycobacterium abscessus* // *Microorganisms.* – 2021. – V. 9. – № 4. – P. 676.
111. Maciag A., Peano C., Pietrelli A., Egli T., De Bellis G., Landini P. In vitro transcription profiling of the sigmaS subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the sigmaS regulon and identification of sigmaS-specific promoter sequence elements // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № 13. – P. 5338–5355.
112. Mahapatra S., Scherman H., Brennan P. J. and Crick D. C. N Glycolylation of the nucleotide precursors of peptidoglycan biosynthesis of *Mycobacterium spp.* is altered by drug treatment // *J Bacteriol.* – 2005a. – V. 187. – P. 2341–2347.
113. Malhotra S., Vedithi S.C., Blundell T.L. Decoding the similarities and differences among mycobacterial species // *PLoS Negl Trop.* – 2017. – V. 11. – № 8. – P. e0005883.
114. Marrakchi H., Lanéeelle G., Quémard A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II // *Microbiology.* – 2000. – V. 146. – № 2. – P. 289–296.

115. Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria // J Bacteriol. – 1999. – V. 181. – № 23. – P. 7331-7338.
116. Mathew R., Ojha A.K., Karande A.A., Chatterji D. Deletion of the *rel* gene in *Mycobacterium smegmatis* reduces its stationary phase survival without altering the cell-surface associated properties // Curr Sci. – 2004. – V. 86. – P. 149-153.
117. Mathieu A., Fleurier S., Frénoy A., Dairou J., Bredeche M.F., Sanchez-Vizueté P., Song X., Matic I. Discovery and Function of a General Core Hormetic Stress Response in *E. coli* Induced by Sublethal Concentrations of Antibiotics // Cell Rep. – 2016. – V. 17. – № 1. – P. 46-57.
118. Matsuyama T., Bhasin A., Harshey R.M. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium // J Bacteriol. – 1992. – V. 177. – № 4. – P. 9879-9891.
119. Matsuyama T., Kaneda K., Nakagawa Y., Isa K., Hara-Hotta H., Yano I. A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens* // J Bacteriol. – 1992. – V. 174. – № 6. – P. 1769-1776.
120. McNeil M., Wallner S.J., Hunter S.W., Brennan P.J. Demonstration that the galactosyl and arabinosyl residues in the cell-wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid // Carbohydr Res. – 1987. – V. 166. – P. 299-308.
121. McNeil M.B., Dennison D., Parish T. Mutations in MmpL3 alter membrane potential, hydrophobicity and antibiotic susceptibility in *Mycobacterium smegmatis* // Microbiology. – 2017. – V. 163. – № 7. – P. 1065-1070.
122. Merritt J.H., Brothers K.M., Kuchma S.L., O'Toole G.A. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function // J Bacteriol. – 2007. – V. 189. – № 22. – P. 8154-8164.
123. Meyer A. Orientierende Untersuchungen ueber Verbreitung, Morphologie, und Chemie des Volutins // Bot Zeit. – 1994. – V. 62. – P. 113-152.
124. Michael A.J. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea // J Biol Chem. – 2016. – V. 291. – № 29. – P. 14896-14903.
125. Mittenhuber G. Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins) // J Mol Microbiol Biotechnol. – 2001. – V. 3. – № 4. – P. 585-600.
126. Morimoto K., Iwai K., Uchimura K., Okumura M., Yoshiyama T., Yoshimori K., Ogata H., Kurashima A., Gemma A., Kudoh S. A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan // Ann Am Thorac Soc. – 2014. – V. 11. – P. 1-8.
127. Morris D.R. Putrescine biosynthesis in *Escherichia coli* regulation through pathway selection // J Biol Chem. – 1969. – V. 244. – P. 6094-6099.
128. Morrissey J.H., Choi S.H., Smith S.A. Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation // Blood. – 2012. – V. 119. – № 25. – P. 5972-5979.

129. Murray T.S., Kazmierczak B.I. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella // J Bacteriol. – 2008. – V. 190. – № 8. – P. 2700–2708.
130. Namugenyi S.B., Aagesen A.M., Elliott S.R., Tischler A.D. *Mycobacterium tuberculosis* PhoY proteins promote persister formation by mediating Pst/SenX3-RegX3 phosphate sensing // MBio. – 2017. – V. 8. – P. e00494–e00417.
131. Navarro Llorens J.M., Tormo A., Martínez-García E. Stationary phase in gram-negative bacteria // FEMS Microbiol Rev. – 2010. – V. 34. – № 4. – P. 476–495.
132. Nedeltchev G.G., Raghunand T.R., Jassal M.S., Lun S., Cheng Q.J., Bishai W.R. Extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* but not *Mycobacterium tuberculosis* in a bronchoscopic rabbit model of cavitary tuberculosis // Infect Immun. – 2009. – V. 77. – № 2. – P. 598–603.
133. Neilands J., Kinnby B. Porphyromonas gingivalis initiates coagulation and secretes polyphosphates – A mechanism for sustaining chronic inflammation? // Microb Pathog. – 2020. – P. 104648.
134. Nesterova L. Yu., Tsyganov I. V., Tkachenko A. G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 1983. – V. 56. – № 4. – P. 387–394.
135. Niño-Padilla E.I., Velazquez C., Garibay-Escobar A. Mycobacterial biofilms as players in human infections: a review // Biofouling. – 2021. – V. 37. – № 4. – P. 410–432.
136. Noegel A., Gotschlich E.C. Isolation of a high molecular weight polyphosphate from *Neisseria gonorrhoeae* // J Exp Med. – 1983. – V. 157. – № 6. – P. 2049–2060.
137. Nogales J., Bernabéu-Roda L., Cuéllar V., Soto M.J. ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti* // J Bacteriol. – 2012. – V. 194. – № 8. – P. 2027–2035.
138. Nogales J., Vargas P., Farias G.A., Olmedilla A., Sanjuán J., Gallegos M.T. FleQ coordinates flagellum-dependent and -independent motilities in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 // Appl Environ Microbiol. – 2015. – V. 81. – № 21. – P. 7533–7545.
139. Nomura K., Kato J., Takiguchi N., Ohtake H., Kuroda A. Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli* // J Biol Chem. – 2004. – V. 279. – № 33. – P. 34406–34410.
140. Ojha A., Anand M., Bhatt A., Kremer L., Jacobs W.R. Jr., Hatfull G.F. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria // Cell. – 2005. – V. 123. – № 5. – P. 861–873.
141. Oren A., Garrity G.M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM // Int J Syst Evol Microbiol. – 2019. – V. 69. – № 1. – P. 13–32.
142. Ortiz-Severín J., Varas M., Bravo-Toncio C., Guiliani N., Chávez F.P. Multiple antibiotic susceptibility of polyphosphate kinase mutants (ppk1 and ppk2) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as revealed by global phenotypic analysis // Biol Res. – 2015. – V. 48. – P. 22.
143. Parish T. Two-Component Regulatory Systems of Mycobacteria // Microbiol Spectr. – 2014. – V. 2. – № 1. – P. MGM2-0010–2013.

144. Park S.Y., Pontes M.H., Groisman E.A. Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* // Proc Natl Acad Sci. U.S.A. – 2015. – V. 112. – № 6. – P. 1850-1855.
145. Paula F.S., Chin J.P., Schnürer A., Müller B., Manesiotis P., Waters N., Macintosh K.A., Quinn J.P., Connolly J., Abram F., McGrath J.W., O'Flaherty V. The potential for polyphosphate metabolism in Archaea and anaerobic polyphosphate formation in *Methanosarcina mazei* // Sci Rep. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 17101.
146. Pegg A.E. Introduction to the Thematic Minireview Series: Sixty plus years of polyamine research // J Biol Chem. – 2018. – P. jbc.TM118.006291.
147. Pegg A.E. Functions of Polyamines in Mammals // J Biol Chem. – 2016. – V. 291. – № 29. – P. 14904-14912.
148. Peng L., Luo W.Y., Zhao T., Wan C.S., Jiang Y., Chi F., Zhao W., Cao H., Huang S.H. Polyphosphate kinase 1 is required for the pathogenesis process of meningitic *Escherichia coli* K1 (RS218) // Future Microbiol. – 2012. – V. 7. – № 3. – P. 411-423.
149. Pollitt E.J.G., Diggle S.P. Defining motility in the Staphylococci // Cell Mol Life Sci. – 2017. – V. 74. – № 16. – P. 2943-2958.
150. Polyudova T.V., Eroshenko D.V., Pimenova E.V. The biofilm formation of nontuberculous mycobacteria and its inhibition by essential oils // Int J Mycobacteriol. – 2021. – V. 10. № 1. – P. 43-50.
151. Quintiliani R., Owens Jr R.C., Grant E.M. Clinical role of fluoroquinolones in patients with respiratory tract infections // Infect Dis Clin Pract. – 1999. – V. 8. № 4. – P. S28-S41.
152. Rabussay D., Zillig W. A rifampicin resistant rna-polymerase from *E. coli* altered in the β -subunit // FEBS letters. – 1969. – V. 5. № 2. – P. 104-106.
153. Rafat C., Debrix I., Hertig A. Levofloxacin for the treatment of pyelonephritis // Expert Opin Pharmacother. – 2013. – V. 14. – P. 1241-1253.
154. Rao N.N., Kornberg A. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli* // J Bacteriol. – 1996. – V. 178. № 5. – P. 1394-400.
155. Rao N.N., Liu S., Kornberg A. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response // J Bacteriol. – 1998. – V. 180. № 8. – P. 2186-2193.
156. Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival // Annu Rev Biochem. – 2009. – V. 78. – P. 605-647.
157. Rashid M.H., Rao N.N., Kornberg A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens // J Bacteriol. – 2000. – V. 182. № 1. – P. 225-227.
158. Rather M.A., Gupta K., Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies // Braz J Microbiol. – 2021. – V. 52. № 4. – P. 1701-1718.
159. Recht J., Martinez A., Torello S., Kolter R. Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis* // J Bacteriol. – 2000. – V. 182. № 15. – P. 4348-4351.
160. Rhee H.J., Kim E.J., Lee J.K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules // J Cell Mol Med. – 2007. – V. 11. № 4. – P. 685-703.

161. Rijal R., Cadena L.A., Smith M.R., Carr J.F., Gomer R.H. Polyphosphate is an extracellular signal that can facilitate bacterial survival in eukaryotic cells // *Proc Natl Acad Sci.* – 2020. – V. 117. № 50. – P. 31923-31934.
162. Rohlfing A.E., Ramsey K.M., Dove S.L. Polyphosphate Kinase Antagonizes Virulence Gene Expression in *Francisella tularensis* // *J Bacteriol.* – 2018. – V. 200. № 3. – P. e00460–17.
163. Rook G.A.W., Hamelmann E., Rosa Brunet L. Mycobacteria and allergies // *Immunobiology.* – 2007. – V. 212. № 6. – P. 461-473.
164. Ryan G.J., Hoff D.R., Driver E.R., Voskuil M.I., Gonzalez-Juarrero M., Basaraba R.J., Crick D.C., Spencer J.S., Lenaerts A.J. Multiple M. tuberculosis phenotypes in mouse and guinea pig lung tissue revealed by a dual-staining approach // *PLoS One.* – 2010. – V. 5. № 6. – P. e11108.
165. Sambandan D., Dao D.N., Weinrick B.C., Vilcheze C., Gurcha S.S., Ojha A., Kremer L., Besra G.S., Hatfull G.F., Jacobs W.R., Keto-mycolic acid-dependent pellicle formation confers tolerance to drug-sensitive *Mycobacterium tuberculosis* // *MBio.* – 2013. – V. 4. № 3. – P. e00222-00213.
166. Schorey J. S., Sweet L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis // *Glycobiology.* – 2008. – V. 18. № 11. – P. 832-841.
167. Seminara A., Angelini T.E., Wilking J.N., Vlamakis H., Ebrahim S., Kolter R., Weitz D.A., Brenner M.P. Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – V. 109. № 4. – P. 1116-1121.
168. Sharma D. Cukras A.R., Rogers E.J., Southworth D.R., Green R. Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome // *J Mol Biol.* – 2007. – V. 374. № 4. – P. 1065-1076.
169. Shiba T., Tsutsumi K., Yano H., Ihara Y., Kameda A., Tanaka K., Takahashi H., Munekata M., Rao N.N., Kornberg A. Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression // *Proc Natl Acad Sci.* – 1997. – V. 94. № 21. – P. 11210-11215.
170. Sirgel F.A., Fourie P.B., Donald P.R., Padayatchi N., Rustumjee R., Levin J., Roscigno G., Norman J., McIlleron H., Mitchison D.A. The early bactericidal activities of rifampin and rifapentine in pulmonary tuberculosis // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2005. – V. 172. № 1. – P. 128-135.
171. Sinha S.K., Rs N., Devarakonda Y., Rathi A., Reddy Regatti P., Batra S., Syal K. Tale of Twin Bifunctional Second Messenger (p)ppGpp Synthetases and Their Function in Mycobacteria // *ACS Omega.* – 2023. – V.8. – P. 32258-32270.
172. Sobe R.C., Bond W.G., Wotanis C.K., Zayner J.P., Burriss M.A., Fernandez N., Bruger E.L., Waters C.M., Neufeld H.S., Karatan E. Spermine inhibits *Vibrio cholerae* biofilm formation through the NspS-MbaA polyamine signaling system // *J Biol Chem.* – 2017. – V. 292. № 41. – P. 17025-17036.
173. Sparks I.L., Derbyshire K.M., Jacobs W.R. Jr., Morita Y.S. *Mycobacterium smegmatis*: The Vanguard of Mycobacterial Research // *J Bacteriol.* – 2023. – V. 205. № 1. – P. e0033722.
174. Speer A., Rowland J.L., Haeili M., Niederweis M., Wolschendorf F. Porins increase copper susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* // *J Bacteriol.* – 2013. – V. 195. – P. 5133-5140.

175. Srisanga K., Suthapot P., Permsirivisarn P., Govitrapong P., Tungpradabkul S., Wongtrakoongate P. Polyphosphate kinase 1 of *Burkholderia pseudomallei* controls quorum sensing, RpoS and host cell invasion // J Proteomics. – 2019. – V. 194. – P. 14-24.
176. Stewart C.R., Burnside D.M., Cianciotto N.P. The surfactant of *Legionella pneumophila* Is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other *Legionella* species // J Bacteriol. – 2011. – V. 193. № 21. – P. 5971-5984.
177. Stewart C.R., Rossier O., Cianciotto N P. Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion // J Bacteriol. – 2009. – V. 191. № 5. – P. 1537-1546.
178. Stewart P.S., Costerton J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms // The lancet. – 2001. – V. 358. № 9276. – P. 135-138.
179. Stokes, J.M., Lopatkin, A.J., Lobritz, M.A., Collins, J.J. Bacterial metabolism and antibiotic efficacy // Cell metabolism. – 2019. – V. 30. №2. – P. 251-259.
180. Strollo S.E., Adjemian J., Adjemian M.K., Prevots D.R. The burden of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in the United States // Ann. Am. Thorac. Soc. – 2015. – V. 12. № 10. – P. 1458-1464.
181. Suess P.M., Chinae L.E., Pilling D., Gomer R.H. Extracellular Polyphosphate Promotes Macrophage and Fibrocyte Differentiation, Inhibits Leukocyte Proliferation, and Acts as a Chemotactic Agent for Neutrophils // J Immunol. – 2019. – V. 203. № 2. – P. 493-499.
182. Sureka K., Dey S., Datta P., Singh A.K., Dasgupta A., Rodrigue S., Basu J., Kundu M. Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria // Mol Microbiol. – 2007. – V. 65. – P. 261-276.
183. Sureka K., Sanyal S., Basu J., Kundu M. Polyphosphate kinase 2: a modulator of nucleoside diphosphate kinase activity in mycobacteria // Mol. Microbiol. – 2009. – V. 74. – P. 1187-1197.
184. Sutherland I.W. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment // Trends Microbiol. – 2001. – V. 9. № 5. – P. 222-227.
185. Tabor C.W. Polyamines in microrganisms // Microbiol Rev. – 1985. – V. 40. № 1. – P. 81–99.
186. Takayama K., Armstrong E.L., Kunugi K.A., Kilburn J.O. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis* // Antimicrob Agents Chemother. – 1979. – V. 16. № 2. – P. 240-242.
187. Takayama K., Kilburn J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis* // Antimicrob Agents Chemother. – 1989. – V. 33. № 9. – P. 1493-1499.
188. Tang-Fichaux M., Chagneau C.V., Bossuet-Greif N., Nougayrède J.P., Oswald É., Branchu P. The Polyphosphate Kinase of *Escherichia coli* is Required for Full Production of the Genotoxin Colibactin // mSphere. – 2020. – V.5. № 6. – P. e01195-01220.
189. Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nesterova L.Y. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics // Res Microbiol. – 2012. – V. 163. – P. 93-91.

- 190.** Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tsyganov I.V., Vaganov V.Y., Shipilovskikh S.A., Rubtsov A.E., Malkov A.V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases // *Cell Chem Biol.* – 2021. – V. 28. № 10. – P. 1-13.
- 191.** Tkachenko A.G., Nesterova L.Yu., Pshenichnov M.R. The role of natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli* // *Arch. Microbiol.* – 2001. – V. 176. – P. 155-157.
- 192.** Tkachenko, A. G., Pozhidaeva, O. N., Shumkov, M. S. Role of polyamines in formation of multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* under stress conditions // *Biochemistry (Moscow).* – 2006. – V. 71. № 9. – P. 1042-1049.
- 193.** Traag B.A., Driks A., Stragier P., Bitter W., Broussard G., Hatfull G., Chu F., Adams K.N., Ramakrishnan L., Losick R. Do mycobacteria produce endospores? // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. № 2. – P. 878-881.
- 194.** Trivedi A., Mavi P.S., Bhatt D., Kumar A. Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis* // *Nat Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 11392.
- 195.** Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics // *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii.* – 2022. – V. 26. – № 5. – P. 458-466.
- 196.** Tunpiboonsak S., Mongkolrob R., Kitudomsub K., Thanwatanaying P., Kiettipirodom W., Tungboontina Y., Tungpradabkul S. Role of a *Burkholderia pseudomallei* polyphosphate kinase in an oxidative stress response, motilities, and biofilm formation // *J Microbiol.* – 2010. – V. 48. № 1. – P. 63-70.
- 197.** Qi W., Jonker M.J., de Leeuw W., Brul S., Ter Kuile B.H. Role of RelA-synthesized (p)ppGpp and ROS-induced mutagenesis in de novo acquisition of antibiotic resistance in *E. coli* // *iScience.* – 2024. – V. 27. № 4. – P. 109579.
- 198.** Varas M.A., Riquelme-Barrios S., Valenzuela C., Marcoleta A.E., Berríos-Pastén C., Santiviago C.A., Chávez F.P. Inorganic Polyphosphate Is Essential for *Salmonella Typhimurium* Virulence and Survival in *Dictyostelium discoideum* // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2018. – V. 8. – P. 8.
- 199.** Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Franssaer J., Vermant J., Michiels J. Living on a surface: swarming and biofilm formation // *Trends Microbiol.* – 2008. – V. 16. № 10. – P. 496-506.
- 200.** Vlamakis H., Chai Y., Beauregard P., Losick R., Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way // *Nat Rev Microbiol.* – 2013. – V. 11. № 3. – P. 157-168.
- 201.** Vollmer W., Blanot D. de Pedro M. A. Peptidoglycan structure and architecture // *FEMS Microbiol Rev.* – 2008. – V. 32. – P. 149-167.
- 202.** Watanabe M., Aoyagi Y., Mitome H., Fujita T., Naoki H., Ridell M. Minnikin D. E. Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; the recognition of new structural principles in mycolic acids // *Microbiology.* – 2002. – V. 148. – P. 1881-1902.
- 203.** Wayne L.G., Sohaskey C.D. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis* // *Annu Rev Microbiol.* – 2001. – V. 55. – P. 139-163.

- 204.** Wehrli W. Knüsel F., Schmid K., Staehelin M. Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase // Proc Natl Acad Sci U.S.A. – 1968. – V. 61. № 2. – P. 667.
- 205.** WHO. Global tuberculosis report 2024. Geneva: World Health Organization. – 2024.
- 206.** Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases // Am Rev Respir Dis. – 1979. – V. 119. № 1. – P. 107-159.
- 207.** Wyk N., Navarro D., Blaise M., Berrin J.G., Henrissat B., Drancourt M., Kremer L. Characterization of a mycobacterial cellulase and its impact on biofilm- and drug-induced cellulose production // Glycobiology. – 2017. – V. 27. № 5. – P. 392-399.
- 208.** Yoshida M., Kashiwagi K., Shigemasa A., Taniguchi S., Yamamoto K., Makinoshima H., Ishihama A., Igarashi K. A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon // J Biol Chem. – 2004. – V. 279. № 44. – P. 46008-46013.
- 209.** Yoshida M., Kashiwagi K., Kawai G. Polyamine enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase sigma (28) subunit // J Biol Chem. – 2001. – V. 276. № 19. – P. 16289-16295.
- 210.** Zamakhaev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycolicibacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // Int J Mycobacteriol. – 2020. – V. 9. – № 2. – P.138-143.
- 211.** Zegadło K., Gieroń M., Żarnowiec P., Durlik-Popińska K., Kręcis B., Kaca W., Czerwonka G. Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infections // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – V. 24. № 2. – P. 1707.
- 212.** Zhai Y., Minnick P.J., Pribis J.P., Garcia-Villada L., Hastings P.J., Herman C., Rosenberg S.M. ppGpp and RNA-polymerase backtracking guide antibiotic-induced mutable gambler cells // Mol. Cell. – 2023. – V. 83. № 8. – P. 1298-1310.e4.
- 213.** Zhang H., Ishige K., Kornberg A. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – V. 99. № 26. – P. 16678-16683.