

На правах рукописи

ЦЫГАНОВ ИВАН ВАДИМОВИЧ

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

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2025

Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ) и лаборатории адаптации микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь.

Научный руководитель: **Ткаченко Александр Георгиевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета.

Официальные оппоненты: **Николаев Юрий Александрович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией выживаемости микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Каюмов Айрат Рашитович, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук (Россия, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4).

Защита состоится «__» _____ 2025 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.201.03 03 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ПФИЦ УрО РАН (г. Пермь, ул. Академика Королева, д. 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<https://www.permsc.ru>)

Автореферат разослан: «__» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности. Одной из ключевых проблем современной противобактериальной терапии остаётся снижение эффективности антибиотиков, обусловленное распространением генетически детерминированных форм антибиотикорезистентных бактерий. Однако не менее значимым фактором, способствующим росту числа хронических инфекций, включая туберкулёз, является физиологическая толерантность бактерий к антибиотикам, связанная с формированием персистентных клеток. Персистентность – это явление, при котором бактерии избегают летального действия антибиотиков за счёт их перехода в персистентное состояние, характеризующееся физиологической невосприимчивостью к антибактериальным препаратам [Stokes *et al.*, 2019]. В быстрорастущей колонии количество персистентов может составлять около 0,01% [Эль-Регистан *и др.*, 2014; Николаев *и др.*, 2020], но наибольшая доля персистентных клеток в популяции микобактерий и других видов формируется в стационарной фазе, поскольку стресс голодания является одним из триггеров, инициирующих персистенцию [Эль-Регистан *и др.*, 2014]. Развитию неспецифической толерантности способствуют поведенческие реакции бактерий, например, формирование биоплёнок [Chakraborty, Kumar, 2019], являющихся преобладающей формой существования бактерий в дикой природе [Николаев, Плакунов, 2007], защищающих клетки от внешних стрессоров, в том числе антибиотиков, и поэтому требующих разработки новых препаратов, нацеленных на подавление биоплёнкообразования [Kayumov, Khakimullina, *et al.*, 2015; Kayumov, Nureeva *et al.*, 2015]. В свою очередь, механизмы «коллективного» перемещения, например, скольжение, усиливают вирулентность патогенных бактерий. Одним из возможных путей решения проблемы персистенции является разработка препаратов, нацеленных на подавление стринджен-ответа – механизма адаптации бактерий к стрессу, ответственного за инициацию персистенции [Hobbs, Boraston, 2019], который, в свою очередь, регулируется при участии малых регуляторных молекул – вторичных мессенджеров, включая алармоны (p)ppGpp. Использование ингибиторов активности алармонсинтетаз, ферментов, ответственных за синтез (p)ppGpp, включая вновь синтезированный аналог метаболитов морских кораллов DMNP [Tkachenko *et al.*, 2021], является перспективным с точки зрения разработки средств подавления персистенции, обусловленной биоплёнкообразованием и перемещением бактерий в пространстве.

Патогенные бактерии, взаимодействуя с тканями организма хозяина, сталкиваются с разнообразием продуктов метаболизма клеток, в том числе, биогенными полиаминами. Ранее опубликованы данные о способности экзогенных полиаминов снижать чувствительность бактерий к антибиотикам [Tkachenko *et al.*, 2012; Igarashi, Kashiwagi, 2018], а также усиливать патогенность бактериальных клеток [Jelsbak *et al.*, 2012; Di Martino *et al.*, 2013]. Поэтому относительно высокие концентрации этих соединений в органах и тканях организма хозяина

предполагают возможность их существенного влияния на эффективность антибиотиков в отношении бактериальных клеток, включая *M. smegmatis* как общепринятой непатогенной экспериментальной модели возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis*.

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

Задачи исследования:

1. Изучить функции алармонсинтеаз 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 работы. Впервые изучено влияние алармонсинтеаз – продуктов генов *rel_{Msm}* и *relZ* – на биоплёнкообразование и скольжение микобактерий. Установлена корреляция между количеством гликопептидолипидов клеточной поверхности микобактерий и их способностью образовывать поверхностные биоплёнки (пелликулы). Впервые показано, что биогенные полиамины – спермидин и спермин – способны оказывать регуляторный эффект на эффективность действия антибиотиков в отношении скользящих клеток микобактерий, а также клеток в составе биоплёнки, путем модуляции внутриклеточных уровней полифосфатов. Впервые показана более высокая подавляющая активность синтетического ингибитора алармонсинтеаз DMNP по сравнению с традиционными антибиотиками в отношении микобактериальных сообществ (биоплёнок и скользящих колоний).

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования расширяют понимание механизмов биоплёнкообразования и скольжения микобактерий. Полученные экспериментальные данные о воздействии полиаминов на скольжение, биоплёнкообразование и антибактериальную активность антибиотиков могут быть использованы для повышения эффективности терапии микобактериозов. Данная в работе оценка активности основных антибиотиков, применяемых при терапии туберкулеза и других

микобактериозов в отношении биоплёнок и скользящих колоний расширяет существующие представления о зависимости их эффективности от условий бактериального окружения в организме хозяина, включая полиамины. Используемые с этой целью приёмы могут применяться для оптимизации поиска новых антибиотиков со специфическими мишенями, действие которых направлено на подавление формирования персистентных клеток, что является перспективным направлением для повышения их терапевтической эффективности и профилактики развития антибиотикорезистентности.

Методология и методы исследования. Экспериментальное решение задач исследования осуществлено с применением биохимических, фотометрических и микробиологических методов, дополненных методами геной инженерии и молекулярной биологии. 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.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Алармонсинтеазы микобактерий, продукты генов *relMsm* и *relZ*, участвуют в процессе формирования биоплёнок.
2. Гликопептидолипиды и полифосфаты обеспечивают поддержание целостности поверхностной биоплёнки и выживаемость включенных 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 алармонсинтеаз, 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. Материалы диссертационного исследования подтверждены результатами многоплановой экспериментальной проверки. Методы проведения исследований изложены в работе и доступны для воспроизведения результатов диссертации в независимых лабораториях. Достоверность экспериментальных данных подтверждается методами статистического анализа. Материалы диссертационной работы представлены на 9 международных и межрегиональных научных конференциях: VI 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.).

Личное участие автора. Выбор направления диссертационной работы, её цели и задач проводился совместно с научным руководителем – д.м.н., проф., А.Г. Ткаченко. Автором проведён анализ литературы и выполнена основная экспериментальная работа: изучение биоплёнкообразования и скольжения микобактерий, влияние на эти процессы биогенных полиаминов, антибиотиков и активности алармонсинтетаз, включая анализ изменений содержания гликопептидолипидов и полифосфатов. Химический синтез 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановой кислоты (DMNP) выполнен сотрудниками Пермского государственного национального исследовательского университета. Исследования клеточной поверхности методом атомно-силовой микроскопии проведены совместно с к.б.н. Л.Ю. Нестеровой.

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

Связь работы с научными программами. Данная работа проводилась при финансовой поддержке: 1) гранта Российского научного фонда «Разработка высокоактивных соединений против резистентных форм туберкулеза с новым механизмом действия» (18-73-10156); 2) гранта Российского научного фонда «Создание нового класса противотуберкулезных соединений на основе синтеза природных дитерпенов выделенных из морских кораллов и их аналогов» (15-13-00092); 3) проекта «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» при поддержке Минобрнауки РФ (АААА-А19-119112290009-1); 4) проекта «Роль полиаминов в регуляции бактериальной персистенции» при поддержке РФФИ и Администрации Пермского края (р_а 16-44-590279).

Структура и объём диссертации. Полный объём диссертации составляет 145 страниц, основные её положения проиллюстрированы 47 рисунками, и 11 таблицами, список литературы содержит 213 библиографических источников. Основная часть диссертации включает 4 главы.

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 участие в генетическом конструировании штаммов, использованных в работе, а также сотрудникам лаборатории органического синтеза ПГНИУ за плодотворное сотрудничество.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

1. Штаммы и условия культивирования

Штамм *Mycobacterium smegmatis* mc² хранили на агаризованной среде LB («Sigma», США). Для эксперимента колонии переносили в 5 мл среды Middlebrook 7H9 с ампициллином (25 мкг/мл) и 0,05% Твин-80, культивировали в шейкере GFL 1092 (37°C, 200 об/мин) до нужной оптической плотности.

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, ATCC #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
<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}	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}	Штамм с двойной делецией <i>rel</i> _{Msm} и <i>relZ</i> и сверхэкспрессией Rel _{Msm}	

Для изучения роли полиаминов в регуляции уровня гликопептидолипидов и полифосфатов, их добавляли в питательную среду до конечной концентрации 2 мМ перед началом культивирования. Скольжение исследовали на среде Middlebrook 7H9 без глицерина с добавлением 0,3% агарозы, чтобы сформировать полужидкую среду. Для изучения влияния полиаминов на рост, содержание полифосфатов и гликопептидолипидов, полиамины добавляли в среду до конечной концентрации 2 мМ.

2. Метод культивирования поверхностных биоплёнок *M. smegmatis*

Выращенную культуру микобактерий отмывали центрифугированием и разводили в среде Middlebrook 7H9 до оптической плотности 1,0. 500 мкл инокулята вносили в предварительно взвешенную чашку Петри диаметром 40 мм (Медполимер, Россия), добавляли 4,5 мл среды Middlebrook 7H9 с антибиотиками до конечной оптической плотности 0,1 (600 нм). Чашки инкубировали 72 часа при 37°C, после чего выращенные биоплёнки фотографировали. Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) и минимальной концентрации, подавляющей биоплёнкообразование (МКПБ), антибиотики вносили в жидкую среду до начала культивирования. Планктонную жидкость использовали для определения МБК посредством высева на КОЕ. За МКПБ принимали минимальную концентрацию, при которой визуально полностью отсутствовала поверхностная биоплёнка, за МБК – минимальную концентрацию, при которой в посевах жидкой среды на КОЕ отсутствовали колонии.

3. Метод культивирования скользящих колоний *M. smegmatis*

Культуру микобактерий отмывали центрифугированием и разводили в физрастворе до оптической плотности 0,2. Суспензию клеток (0,5 мкл) наносили на полужидкую агаризованную среду в центр чашки, дожидались впитывания капли и помещали чашку Петри в герметичный контейнер с влажностью 50%. Инкубировали 16 часов при 37°C, после чего результаты роста фотографировали. Монослой скользящих колоний также фиксировали фотометрически, используя микроскоп МИКМЕД-6 («ЛОМО», Россия) и оборудование для наблюдения методом фазового контраста. Изображения использовали для оценки изменений в скольжении (см. пункт 8 «Компьютерная обработка фотоснимков с целью количественной оценки способности *M. smegmatis* к скольжению в присутствии антибиотиков и полиаминов»).

4. Определение чувствительности *M. smegmatis* к антибиотикам

Для определения МПК антибиотиков в отношении *M. smegmatis*, в 96-луночных планшетах готовили двукратные разведения антибиотиков в среде Middlebrook 7H9 (200 мкл). Планшеты инкубировали при 37°C 72 часа, после чего оценивали рост. МПК оценивали как минимальную концентрацию антибиотика, полностью подавляющую рост. Для учёта влияния антибиотика на рост использовали модифицированный метод Веслополовой [Веслополова, 1995]. Через 24 часа из лунок отбирали 50 мкл культуры, разводили в 450 мкл физраствора и высевали по 10 мкл на агаризованную среду LB (Sigma, США). Чашки инкубировали 72 часа при 37°C. Количество КОЕ/мл рассчитывали по формуле: ЧИСЛО КОЛОНИЙ × СТЕПЕНЬ РАЗВЕДЕНИЯ × 100.

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

Для выделения полифосфатов из культуры отбирали 2 мл пробы, клетки отмывали центрифугированием (15 мин, 12 000 об/мин) в физрастворе. Полифосфаты экстрагировали в 600 мкл 1М NaOH в течение 30 минут [Liu et al., 2019]. После нейтрализации 400 мкл 1М HCl и центрифугирования (15 мин, 12 000 об/мин), супернатант разводили в 20 мМ буфере HEPES (pH 7.0) (1:10). Для анализа 180 мкл пробы смешивали с 20 мкл DAPI (100 мкМоль, Sigma, США) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Флуоресценцию измеряли на микропланшетном ридере INFINITE 200 (TECAN, Швейцария) при длинах волн 415 нм (возбуждение) и 550 нм (излучение) [Aschar-Sobbi et al., 2008; Diaz, Ingall, 2010]. Количество полифосфатов пересчитывали по калибровочному графику [Diaz, Ingall, 2010] и выражали в величинах на 1 мг сухой биомассы.

Для определения сухой биомассы параллельно отбирали 2 мл культуры, фильтровали через предварительно взвешенные фильтры ВЛАДИПОР МФАС-Б-4 (0,22 мкм, Россия) и сушили до постоянного веса (16 часов, 105°C). Чистую сухую массу клеток рассчитывали как разность между массой высушенного фильтра с клетками и массой контрольного фильтра, учитывая коэффициент усыхания.

6. Определение содержания гликопептидолипидов в штаммах *M. smegmatis*

Бактериальные культуры, выращенные до поздней стационарной фазы, уравнивали по биомассе, концентрировали центрифугированием (20 мин, 3000 об/мин) и отмывали физраствором. Клеточный осадок растворяли в смеси хлороформ:метанол (2:1) и разрушали ультразвуком (4 цикла по 30 минут при 50°C). После центрифугирования (10 мин, 13000 об/мин) супернатант смешивали с дистиллированной водой (1:1), органическую фазу отбирали и выпаривали. Пробы растворяли в системе хлороформ:метанол (9:1) и наносили на пластины с силикагелем 60 («Merck», Германия) для тонкослойной хроматографии (ТСХ). После высушивания нанесённых проб, хроматографию проводили в той же системе растворителей.

При исследовании содержания гликопептидолипидов методом тонкослойной хроматографии, разницу принято отмечать визуально [Martínez et al., 1999; Recht et al., 2000; Liu et al., 2019]. В нашем исследовании количество гликопептидолипидов определяли с помощью анализа изображения хроматограмм, путем расчёта отношения яркости пробы к стандарту с учетом разведения. Содержание гликопептидолипидов (ГПЛ) оценивали относительно контроля (родительский штамм без делеций и полиаминов), используя метод, аналогичный измерению полиаминов.

7. Определение гидрофобности бактериальной оболочки

Культуры штаммов, выращенные до оптической плотности 1,5 (600 нм), отмывали РUM-буфером [McNeil, Dennison, Parish, 2017] и доводили до оптической плотности 0,8 (590 нм). Клетки обрабатывали 0,5%-ным раствором гексадекана, встряхивая в течение 15 секунд, отстаивали 30 минут, после чего измеряли оптическую плотность водной фазы (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.

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

Для определения площадей скользящей колоний на цифровой фотографии использовали инструмент «быстрое выделение» в Adobe Photoshop СС 2015.5 (Adobe, США). Колонию выделяли вручную, подсчитывали число пикселей с помощью инструмента «гистограмма». Площадь одного пикселя рассчитывали как квадрат отношения диаметра чашки (40 мм) к диаметру в пикселях на фото. Площадь пикселя затем умножали на число пикселей колонии.

Для измерения межклеточного пространства в скользящей колонии, цифровое изображение монослоя преобразовывали в монохромное (чёрно-белое) с компьютерной регулировкой контрастности и яркости до полного разделения фото на «белые пиксели» (межклеточное пространство) и «чёрные пиксели» (клетки). Количество межклеточного пространства определяли с помощью инструмента «гистограмма» как долю белых пикселей от общего числа пикселей на фото.

9. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., 2006). Результаты представлены в виде медианы с 25% и 75% перцентилями или средних значений со стандартной ошибкой (указано в подписях к рисункам). Для оценки статистической значимости различий применяли критерий Манна-Уитни (для двух независимых групп). Метод оценки указан в подписях к рисункам. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Функции алармонсинтеаз в формировании биоплёнок и скольжении при переходе культуры *M. smegmatis* в стационарную фазу роста.

Микобактерии формируют преимущественно поверхностные биоплёнки (пелликулы) на границе жидкой и воздушной фаз [Ojha *et al.*, 2005], что позволяет наглядно оценить изменения процессов биоплёнкообразования при воздействии различных факторов. Делеция генов *rel_{Msm}* и *relZ* приводила к качественному нарушению биоплёнкообразования:

поверхностные биоплёнки фрагментировались и оседали на дно (Рисунок 1 А). При этом суммарная масса фрагментов биоплёнки у мутантных штаммов статистически не отличалась от массы цельной биоплёнки родительского штамма (Рисунок 1 В). Индукция сверхэкспрессионной плазмиды с геном *rel_{Msm}* или *relZ* в мутантных штаммах восстанавливала их способность формировать биоплёнки (Рисунок 1 А), при этом эффект не зависел от того, индуцировалась экспрессия *rel_{Msm}* или *relZ*, что свидетельствует об участии обеих изучаемых алармонсинтетаз в регуляции биоплёнкообразования микобактерий.

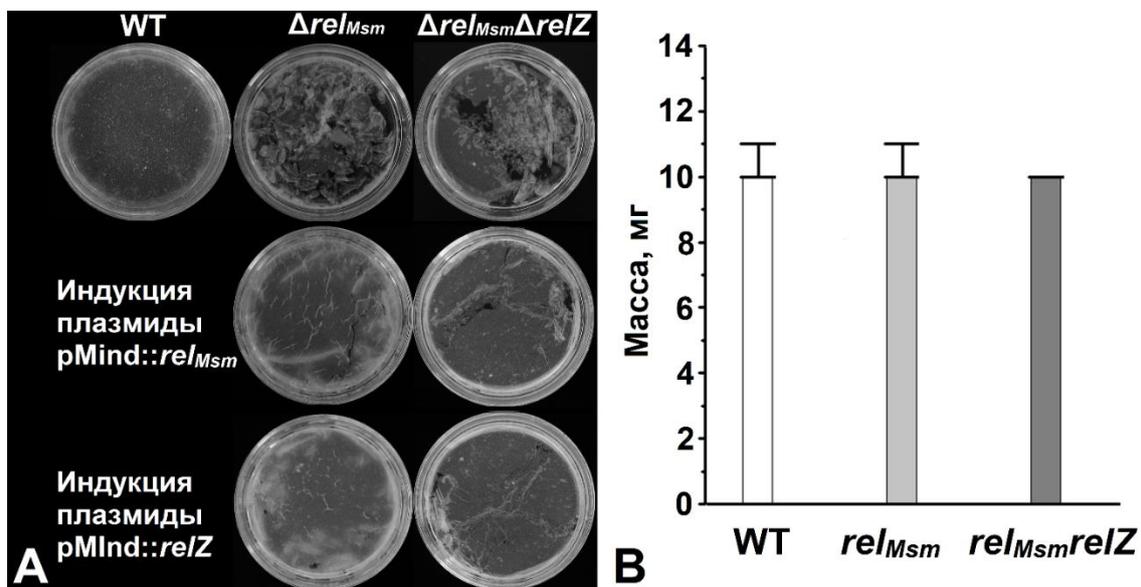


Рисунок 1. Влияние алармонсинтетаз на биоплёнкообразование микобактерий. (А) Структура поверхностных биоплёнок различных штаммов *M. smegmatis* mc² 155. (В) Биомасса биоплёнок штаммов микобактерий *M. smegmatis* mc² 155.

Исследование характера распределения клеток в монослое колоний, выращенных на полужидком агаре (Рисунок 2 В), подтвердило влияние делеций алармонсинтетаз на скольжение: отсутствие *rel_{Msm}* приводило к возрастанию площади скользящих колоний (Рисунок 2 С) как результат увеличения межклеточного пространства (Рисунок 2 D). Это свидетельствует о том, что увеличение диаметра скользящей колонии обусловлено возрастанием скорости скольжения клеток, но не усилением их пролиферации.

Таким образом, алармонсинтетазы микобактерий участвуют в процессах регуляции биоплёнкообразования и скольжения. Функционирование алармонсинтетаз обеспечивает целостность и плавучесть поверхностных биоплёнок. При этом «большая» алармонсинтетаза *rel_{Msm}*, обладающая также гидролазной активностью [Jain *et al.*, 2006], ограничивает скольжение.

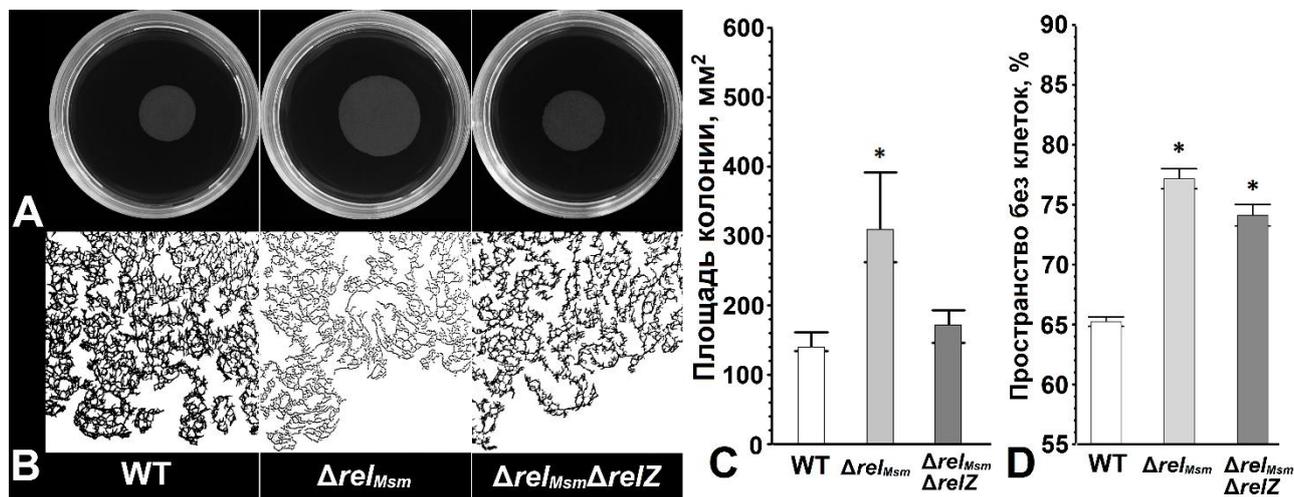


Рисунок 2. Влияние алармонсинтеаз на скольжение *M. smegmatis* mc² 155. (А) (фото) Скользящие колонии штаммов *M. smegmatis* mc² 155. (В) Микрофотографии монослоя колоний (С). Значения площади скользящих колоний *M. smegmatis* mc² 155 и его производных штаммов. (D) Плотность расположения бактерий в скользящих колониях *M. smegmatis* mc² 155. * – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155 без делеций (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

2. Роль гликопептидолипидов и полифосфатов в формировании биоплёнок и скольжении микобактериальных клеток.

Для установления механизма регуляции процессов биоплёнкообразования и скольжения исследовано влияние алармонсинтеаз на содержание гликопептидолипидов (ГПЛ) – компонентов клеточной оболочки микобактерий, а также полифосфатов – внутриклеточных регуляторов стринджен-ответа. Гликопептидолипиды – это гидрофобный компонент клеточной оболочки микобактерий, обеспечивающий их плавучесть и снижающий сцепление с гидрофильной поверхностью [Recht et al., 2000]. Сравнительный анализ содержания ГПЛ у штаммов *M. smegmatis* показал уменьшение их содержания по мере возрастания числа делеций по алармонсинтеазам (Рисунки 3 А, В). Исследование влияния алармонсинтеаз на внутриклеточные уровни полифосфатов показало, что делеция большой алармонсинтеазы *rel_{Msm}*, которая выполняет как синтетазную, так и гидролазную функции, приводила к значительному возрастанию уровней полифосфатов относительно родительского штамма. В то же время, делеция обоих генов, кодирующих алармонсинтеазы микобактерий (*rel_{Msm}* и *relZ*), сопровождалась небольшим снижением уровней полифосфатов относительно родительского штамма (Рисунок 3 С).

Полученные данные свидетельствуют о том, что алармонсинтеазы микобактерий способны регулировать биоплёнкообразование посредством модуляции уровней ГПЛ в клеточных оболочках, определяющих значение их гидрофобности и, соответственно, свойство

плавучести поверхностных биоплёнок. Скольжение, в свою очередь, не зависит от изменения количества ГПЛ и гидрофобности, но его интенсивность коррелирует с ростом концентрации полифосфатов в клетках. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,75, что указывает на их участие в регуляции этого процесса.

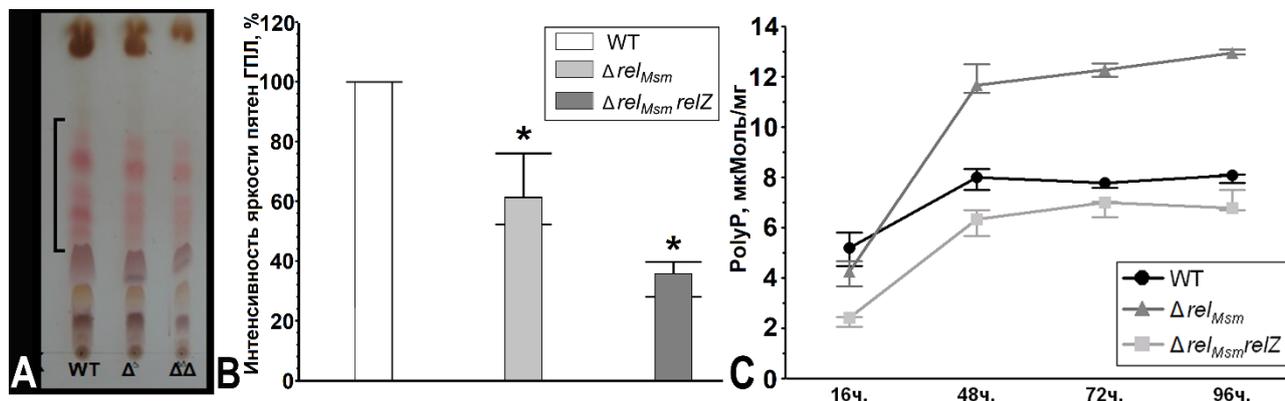


Рисунок 3. Влияние алармонсинтетаз на продукцию ГПЛ и полифосфатов в клетках штаммов *M. smegmatis* mc² 155. (А) (фото) Хроматограмма спектра ГПЛ экстрагированных из бактерий штаммов *M. smegmatis* mc² 155. Боковой скобкой обозначена область локализации пятен ГПЛ. (В) Сравнение интенсивности яркости пятен ГПЛ относительно родительского штамма без делеций генов. (С) Влияние алармонсинтетаз на уровни полифосфатов в клетках штаммов *M. smegmatis* mc² 155. * – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155 (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

3. Регуляторный эффект полиаминов на синтез гликопептидолипидов и полифосфатов в процессе формирования биоплёнок и скольжения.

Известно, что биогенные полиамины модулируют множество функции бактерий, оказывая влияние на адаптацию бактерий к стрессам, в том числе к действию антибиотиков [Tkachenko et al., 2012, Speer et al., 2013, Igarashi, Kashiwagi, 2018], хотя механизмы их действия остаются предметом исследований [Cardile et al., 2017; Sobe et al., 2017]. Большинство организмов способны синтезировать полиамины, поэтому в тканях эукариот часто присутствуют их миллимолярные концентрации, преимущественно представленные спермидином и спермином [Igarashi, Kashiwagi, 2010]. Учитывая ранее опубликованные данные о функциональной активности полиаминов [Ткаченко и др. 1999; Ткаченко и др. 1999; Igarashi, Kashiwagi, 2018], это предположительно могло бы повлиять на процессы биоплёнкообразования, скольжения, а также адаптацию к действию антибиотиков.

В данной диссертационной работе показано, что внесение спермидина и спермина в среду культивирования приводило к восстановлению целостности и поверхностной локализации биоплёнок, у штаммов с делециями генов, кодирующих алармонсинтетазы (Рисунок 4 А), а также способствовало возрастанию массы биоплёнок у всех штаммов

(Рисунок 4 В). Это происходит за счёт усиления полиаминами гидрофобности клеточной оболочки микобактерий (Рисунок 4 С). Наибольший результат демонстрировал спермин.

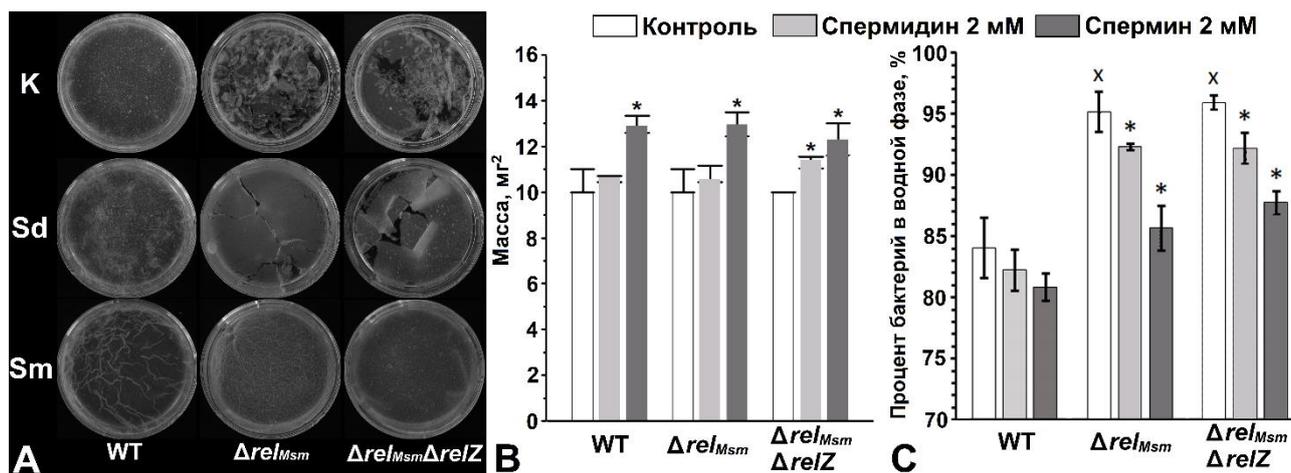


Рисунок 4. Влияние полиаминов на биоплёнокообразование микобактерий. (А) (фото) Структура поверхностных биоплёнок различных штаммов *M. smegmatis* mc² 155, (В) Масса биоплёнок *M. smegmatis* mc² 155, выращенных в жидкой питательной среде Middlebrook. (С) Процент клеток штаммов *M. smegmatis* mc² 155, оставшихся в водной фазе после экспозиции с гексадеканом, от количества до экспозиции (снижение означает рост гидрофобности). Sd – спермидин, Sm – спермин. * – 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, $p \leq 0,05$).

Усиление гидрофобности в присутствии спермина является следствием возрастания количества гликопептидолипидов в клеточной оболочке (Рисунок 5 А). Внесение спермидина не повышало концентрацию ГПЛ (Рисунок 5 В), но изменения гидрофобности, вызванные его добавлением в среду культивирования (Рисунок 4 С) косвенно указывают на участие в процессе биоплёнокообразования, наряду с ГПЛ, других гидрофобных молекул.

Полиамины оказывали разнонаправленный эффект на скольжение штаммов *M. smegmatis*: спермидин усиливал скольжение, в то время как спермин замедлял его (Рисунок 6 А). Это отражалось на плотности клеток в монослоях, выращенных в присутствии поликатионов (Рисунок 6 В). Увеличение и уменьшение площадей колоний (Рисунок 6 С), сопровождалось соответствующим изменением доли межклеточного пространства в монослоях колоний (Рисунок 6 D). Действие полиаминов модулировало только процесс скольжения, но не влияло на пролиферацию клеток, косвенным доказательством чего, помимо изменений плотности клеток в колониях, является также приблизительно равное количество КОЕ/мл в культурах тех же штаммов, выращенных в жидкой среде в аналогичных условиях (Рисунок 6 С).

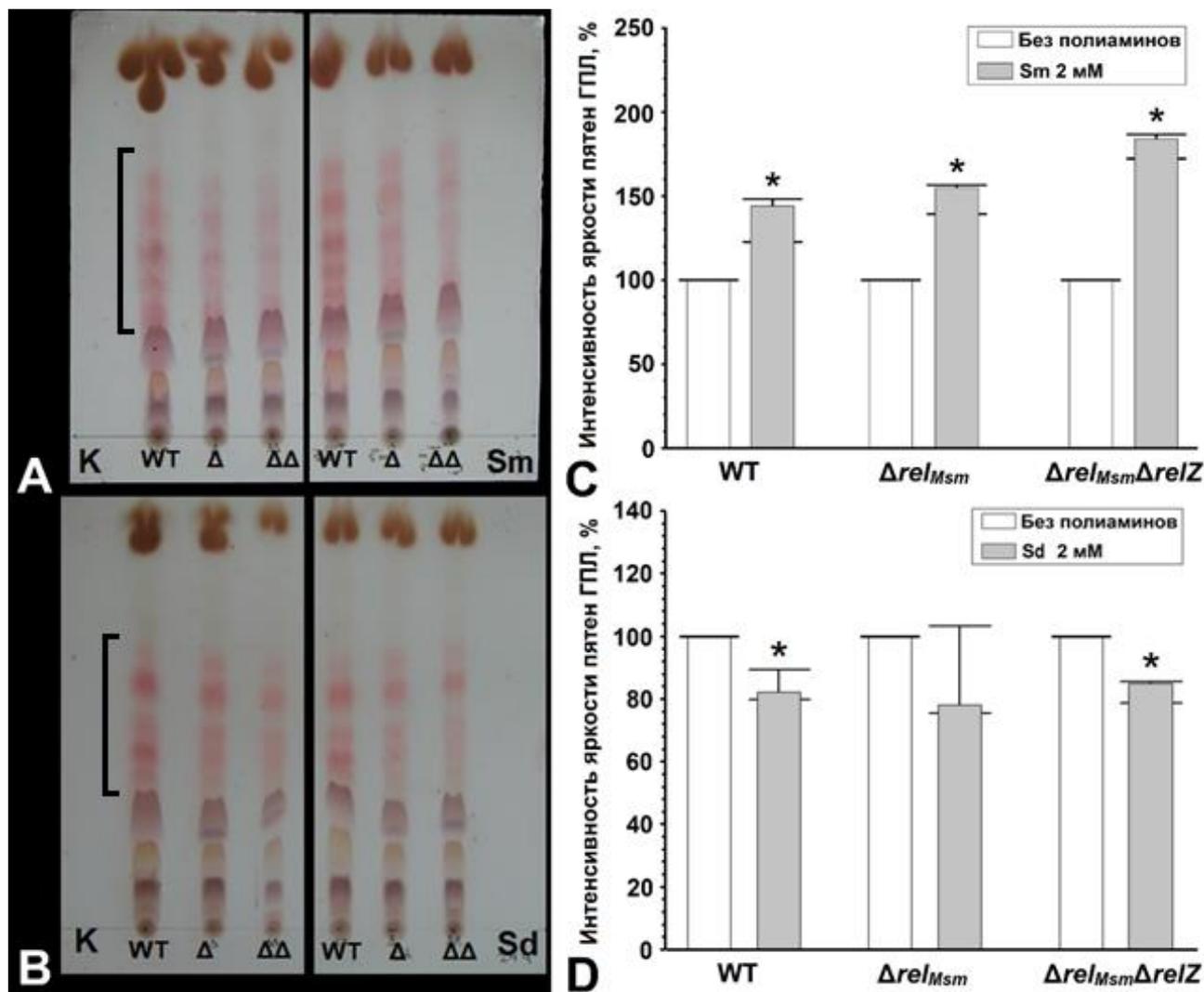


Рисунок 5. Влияние полиаминов на содержание ГПЛ в клетках различных штаммов *M. smegmatis* mc² 155 (А) (фото) Хроматограмма спектра ГПЛ, экстрагированных из штаммов бактерий *M. smegmatis* mc² 155, выращенных в присутствии 2 мМ спермина и в его отсутствии. (В) Сравнение содержания ГПЛ по интенсивности яркости пятен при добавке 2 мМ спермина относительно контролей, выращенных без полиамина (С) (фото) Хроматограмма спектра ГПЛ экстрагированных из штаммов бактерий *M. smegmatis* mc² 155, выращенных в присутствии 2 мМ спермидина и без него. (D) Сравнение содержания ГПЛ по интенсивности яркости пятен при добавке 2 мМ спермидина относительно контролей, выращенных без полиамина., Sm – спермин, Sd – спермидин * – Статистически значимое отличие от контроля, выращенного без добавления полиамина (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Исследование влияния экзогенных полиаминов на уровни полифосфатов в культурах различных штаммов *M. smegmatis* показало, что, по сравнению с контролем (Рисунок 7 А) спермидин и спермин преимущественно снижали концентрации полифосфатов (Рисунки 7 В, С). Исключение составлял только штамм с делецией обеих алармонсинтетаз, у которого уровни полифосфатов в присутствии спермина возрастали.

В то же время модуляция процесса скольжения микобактерий, вызванная внесением полиаминов в среду, не связана с изменением гидрофобности или внутриклеточными концентрациями полифосфатов.

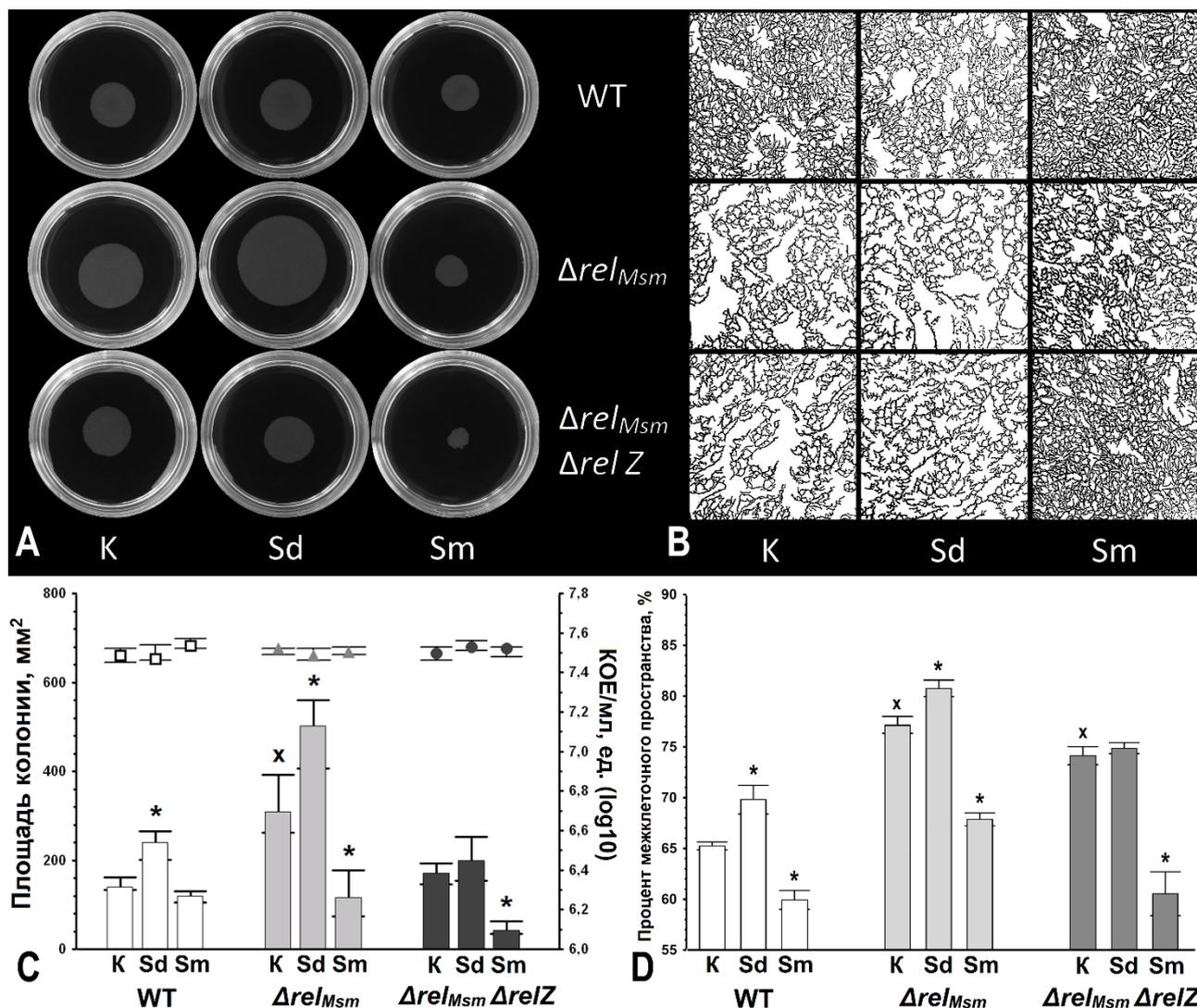


Рисунок 6. Влияние полиаминов на скольжение штаммов *M. smegmatis* mc² 155. (А) (фото) Скользящие колонии *M. smegmatis*. (В) Микрофотографии монослоя колоний. (С) Площади скользящих колоний штаммов *M. smegmatis*, выращенных в присутствии и отсутствии полиаминов (столбцы), а также КОЕ/мл культур штаммов *M. smegmatis*, выращенных в аналогичных условиях (данные в верхней части рисунка). (D) Соотношение площадей межклеточного пространства в монослоях скользящих колоний *M. smegmatis*, выращенных на среде с полиаминами, к общей площади. Sd – спермидин 2 мМ, Sm – спермин 2 мМ. * – Статистически значимое отличие от контроля, выращенного без добавления полиамина (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$). ^x – Статистически значимое отличие от родительского штамма *M. smegmatis* (WT) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

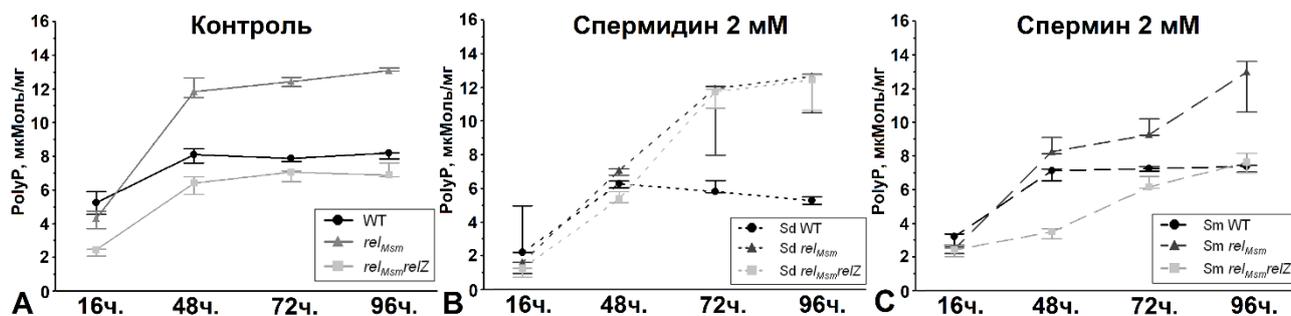


Рисунок 7. Влияние полиаминов на уровни полифосфатов (PolyP) в клетках различных штаммов *M. smegmatis* mc² 155.

(А) – без добавления в среду полиаминов. (В) – при добавлении 2 мМ спермидина (Sd). (С) – при добавлении 2 мМ спермина (Sm). Полиамины вносили в исходную питательную среду вместе с инокулятом клеток.

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

Исследование эффективности действия антибиотиков на уровне формирования факторов вирулентности, таких как биоплёнкообразование (персистенция) и перемещение клеток в окружающей среде (скольжение в случае с микобактериями), является актуальной задачей, поскольку представляют собой основные поведенческие процессы, обеспечивающие защиту бактериальных клеток от неблагоприятных факторов в естественных условиях их пребывания посредством персистенции и колонизации среды.

Поскольку абсолютное большинство бактерий в природе существует в составе сообществ, таких как биоплёнки, но не в форме отдельных свободноживущих бактерий [Николаев, Плакунов, 2007], эффективность традиционных антибиотиков, например, стрептомицина и рифампицина, активных преимущественно в отношении свободно живущих микобактерий и применяемых в качестве антибиотиков первого ряда при туберкулезе, может снижаться. Данный эффект может также усиливаться появлением персистентных форм бактерий в составе биоплёнок. Поэтому использование, наряду с традиционными антибиотиками, препаратов, нацеленных на подавление персистенции, биоплёнкообразования и скольжения, могло бы способствовать повышению эффективности терапии инфекций. Одним из претендентов на эту роль может рассматриваться химически синтезированный аналог метаболита кораллов – эрогоргиеаена – 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановая кислота (DMNP). Ранее нами показано, что мишенями DMNP являются алармонсинтетазы микобактерий Rel_{Msm} и RelZ [Tkachenko *et al.*, 2021]. Поскольку нами впервые продемонстрировано участие алармонсинтеаз микобактерий в регуляции процессов

биоплёнообразования и скольжения, в данной работе поставлена задача дать оценку эффективности действия ингибитора алармонсинтетаз DMNP на биоплёнообразование *Mycobacterium smegmatis* в сравнении с традиционными антибиотиками. Эта задача решена посредством сравнения значений минимальной бактерицидной концентрации (МБК) и минимальной концентрации, подавляющей биоплёнообразование (МКПБ) для DMNP и каждого из исследованных традиционных антибиотиков. МБК определяли как минимальную концентрацию, предотвращающую формирование биоплёнки и вызывающую гибель всех микобактериальных клеток, включая планктонные, а МКПБ — как минимальную концентрацию, при которой формирование биоплёнки не происходит, но планктонные клетки сохраняют жизнеспособность. Для корректного сравнения эффективности использованных антибиотиков, предварительно были определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) для каждого из них: DMNP – 95 мкг/мл, рифампицин – 4,8 мкг/мл, стрептомицин – 0,12 мкг/мл. В дальнейшем для удобства сравнения значений МБК и МКПБ их выражали в единицах, кратных МПК для каждого антибиотика (Таблица 2).

Таблица 2 – Минимальные концентрации антибиотиков, подавляющие формирование биоплёнок (МКПБ) и минимальные бактерицидные концентрации (МБК) у штамма *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. Значения выражены в единицах МПК для каждого антибиотика.

	DMNP	Рифампицин	Стрептомицин
МКПБ	2,4	4,7	0,8
МБК	4,7	23	1,6

Наименьшую эффективность в отношении сообществ биоплёнок показал рифампицин – его МБК и МКПБ многократно превосходили аналогичные показатели двух других антибиотиков. Наибольшую эффективность продемонстрировал стрептомицин. DMNP несколько уступал в эффективности стрептомицину. Исследование эффективности антибиотиков против скользящих сообществ микобактерий важно для оценки их способности ограничивать распространение бактерий. Мы сравнивали традиционные антибиотики (рифампицин, стрептомицин) с ингибитором персистенции DMNP, эффективным против клеток в стационарной фазе. Для оценки влияния на скольжение, использовали сублетальные концентрации, не снижавшие жизнеспособность бактерий (DMNP, стрептомицин — до 0,1 МПК; рифампицин — до 0,02 МПК). Наибольшее ограничение скольжения вызывал рифампицин, поскольку обладал наименьшей концентрацией, статистически значимо ограничивавшей скольжение – 0,01 МПК. Наименьшее — стрептомицин. DMNP превосходил по эффективности ограничения скольжения стрептомицин, поскольку при наименьшей концентрации (0,05 МПК) он вызывал наибольшее снижение площади колонии (Рисунок 8).

Различие в эффективности антибиотиков, вероятно, связано с механизмами действия их на клетки: традиционные препараты оказывают меньшее воздействие непосредственно на скольжение, но способны замедлять пролиферацию клеток, тогда как DMNP менее эффективен в отношении клеток в экспоненциальной фазе, но способен влиять на скольжение, так как его мишенью является алармонсинтетаза, участвующие в регуляции скольжения (Рисунок 2).

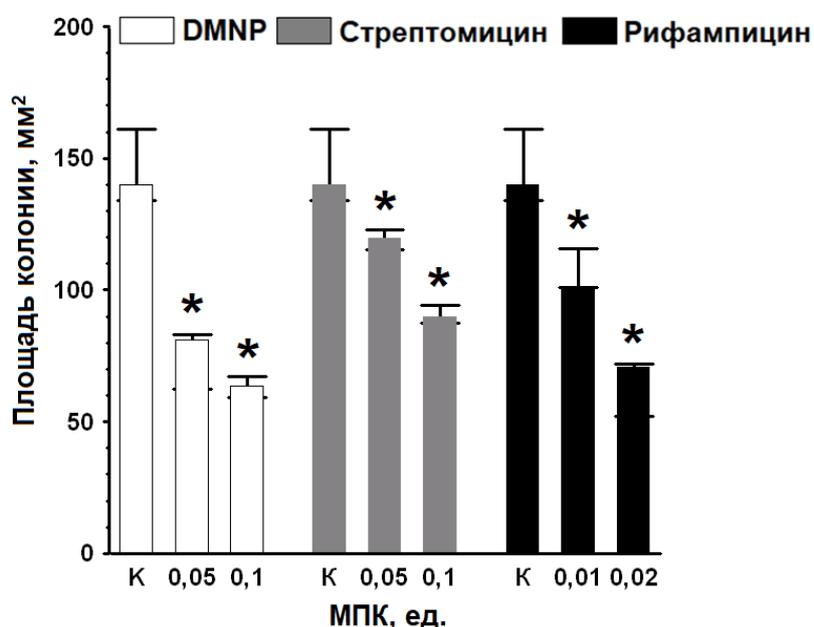


Рисунок 8. Зависимость скольжения родительского штамма *M. smegmatis* mc² 155 от традиционных антибиотиков и DMNP. К – контроль без добавления антибиотика. * – Статистически значимое отличие контроля без антибиотиков (К) (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$).

Поскольку ранее нами показано, что спермин способствует биоплёнкообразованию (Рисунок 4), а также учитывая то, что данный метаболит встречается преимущественно в тканях многоклеточных организмов, в данной работе проведена оценка способности спермина оказывать влияние на эффективность действия антибиотиков в отношении биоплёнок. Несмотря на то, что спермин стимулирует биоплёнкообразование и увеличивает массу биоплёнок (Рисунок 4), его совместное действие с DMNP снижает адаптационные возможности микобактерий. Это проявляется в виде уменьшения МКПБ, причём различие между концентрациями МКПБ и МБК при этом возрастает, что указывает на повышение эффективности подавления биоплёнкообразования (Таблица 3). Добавление спермина также повышало чувствительность микобактерий к рифампицину. В присутствии рифампицина и спермина МКПБ снижалась, что указывает на повышение эффективности антибиотика в отношении биоплёнок. Однако, несмотря на это, действие рифампицина оставалось наименьшим среди антибиотиков (Таблица 3). Стрептомицин был единственным

антибиотиком, чьи показатели МКПБ и МБК не снижались при добавлении полиаминов, а, наоборот, возрастали (Таблица 3). Как следствие, его эффективность в присутствии спермина снижалась до уровня DMNP в отсутствие полиаминов (Таблица 2).

Таблица 3 – Влияние спермина на минимальные концентрации антибиотиков, подавляющие формирование биоплёнок (МКПБ), и минимальные бактерицидные концентрации (МБК). Значения выражены в единицах МПК для каждого антибиотика.

	DMNP		Рифампицин		Стрептомицин	
	WT	WT + Sm 2 мМ	WT	WT + Sm 2 мМ	WT	WT + Sm 2 мМ
МКПБ	2,4	0,4	4,7	1,2	0,8	1,2
МБК	4,7	4,7	23	23	1,6	4,7

Усиление действия антибиотиков в присутствии спермина, несмотря на его общий положительный эффект в отношении биоплёнкообразования, по-видимому, связано с тем, что спермин сильнее всего снижал внутриклеточные уровни полифосфатов (Рисунок 7). Поскольку полифосфаты являются важным компонентом инициации адаптации бактерий к стрессу, снижение их концентраций негативно сказывается на выживаемости микобактерий в присутствии антибиотиков.

Таким образом, ингибитор персистенции DMNP показал высокую эффективность в отношении биоплёнок и скользящих колоний микобактерий, в то время как традиционные антибиотики могли эффективно подавлять только одну из форм коллективных реакций. Рифампицин, в ряду исследованных антибиотиков, демонстрировал максимальный подавляющий эффект на скольжение, но был наименее эффективен в отношении биоплёнок, в то время как стрептомицин успешно подавлял биоплёнкообразование, но демонстрировал слабый эффект в отношении скользящих колоний. Спермин, являясь естественным продуктом тканей человека и животных, усиливал воздействие DMNP на биоплёночные сообщества, что свидетельствует о его наибольшей эффективности как ингибитора роста биоплёнок среди исследованных нами соединений. Это даёт основание рассматривать DMNP как перспективное соединение для разработки лечебного препарата, предназначенного для подавления микобактериальных инфекций в тканях человека и животных, где наблюдается высокое содержание полиаминов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена исследованию механизма регуляции биоплёнкообразования и скольжения *Mycobacterium smegmatis*, а также роли алармонсинтетаз, гликопептидолипидов и биогенных полиаминов в этих процессах. Дана сравнительная оценка воздействия традиционных противотуберкулёзных антибиотиков (рифампицина и стрептомицина) и вновь синтезированного ингибитора персистенции с условным названием DMNP [Tkachenko *et al.*, 2021] на биоплёнкообразование и скольжение с целью разработки

рекомендаций по повышению эффективности антимикробной терапии. Результаты исследования продемонстрировали модуляцию биоплёнкообразования алармонсинтетазами посредством изменения состава клеточной оболочки микобактерий, а также воздействия полиаминов на данный процесс. Установлено, что в процессе формирования биопленок происходит изменение количества гликопептидолипидов в клеточной оболочке микобактерий *M. smegmatis*, в регуляции которого принимают участие алармонсинтетазы Rel_{Msm} и RelZ, ответственные за синтез алармонов (p)ppGpp. Показана роль гликопептидолипидов в формировании гидрофобности клеточной оболочки, что обеспечивает сохранение структуры и плавучести поверхностных биоплёнок. Биогенные полиамины также способствуют биоплёнкообразованию за счёт усиления гидрофобности. Наибольший эффект демонстрировал спермин, повышавший содержание гликопептидолипидов в клеточных оболочках. Экспериментально доказано отсутствие прямой связи между скольжением микобактерий и гидрофобностью клеточной оболочки, что ставит под сомнение сложившееся ранее представление о механизме скольжения [Recht et al., 2000]. В то же время обнаружена положительная корреляция между концентрацией полифосфатов и скольжением микобактерий. Показана более высокая эффективность DMNP в подавлении биоплёнкообразования по сравнению с традиционными антибиотиками и усиление его эффекта в присутствии полиаминов. Это даёт основание рассматривать DMNP как соединение, перспективное для разработки лечебного препарата, предназначенного для подавления микобактериальных инфекций в тканях человека и животных.

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 алармонсинтетазам, 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: биоплёнообразование 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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Перспективно использование DMNP в комплексе с другими антибиотиками, например, рифампицином для более эффективной борьбы как с быстрорастущими, так и dormantными клетками в составе биоплёнок. Преимущество DMNP также заключается в усилении его антибактериальной активности в присутствии биогенных полиаминов, в отличие от стрептомицина, эффективность которого снижается под их влиянием. Показанное нами участие алармонсинтеаз в регуляции содержания полифосфатов, обеспечивающих адаптацию микобактерий к стрессу, подтверждает перспективность разработки технологии использования DMNP для лечения микобактериозов. Поскольку скольжение – единственный способ движения микобактерий, полученные нами данные об участии алармонсинтеаза в его регуляции в перспективе могут способствовать разработке новых стратегий лечения микобактериозов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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 алармонсинтеаз и поиск подобной активности для уже существующих антибиотиков.
4. Более детальное исследование механизма влияния полиаминов на активность ингибитора персистенции DMNP в отношении микобактериальных биоплёнок.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных

ВАК Минобрнауки РФ

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 // *Int J Mycobacteriol.* – 2020. – V. 9. – №2. – P.138-143. (Scopus)
2. Nesterova L. Yu., **Tsyganov I. V.**, Tkachenko A. G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // *Applied Biochem and Microbiol.* – 2020. – V. 56. – №4. – P. 387-394. (Scopus, WoS, ВАК)
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. (Scopus, WoS)
4. **Tsyganov I.V.**, Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics // *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektzii.* – 2022. – V. 26 – №5. – P. 458-466. (Scopus, WoS, ВАК)
5. Нестерова Л.Ю., **Цыганов И.В.**, Ткаченко А.Г. Роль биогенных полиаминов в регуляции скольжения у микобактерий // *Вестник Пермского университета. Серия: Биология.* – Пермь, – 2017. – № 3. – С. 304-310. (ВАК)
6. **Цыганов И.В.**, Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Дифференцированная оценка антибиотиков на способность ограничивать скольжение *Mycobacterium smegmatis* // *Вестник Пермского университета. Серия: Биология.* – Пермь. – 2018. – № 4. – С. 402-408. (ВАК)
7. **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.* – Пермь – 2021. – № 4. С. 263-274. (ВАК)
8. **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.* – Пермь. – 2024. – № 4. – С. 401-411. (ВАК)

Публикации в других журналах и сборниках

1. **Цыганов И.В.**, Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Полиамины как факторы регуляции «поведенческих» реакций микроорганизмов // *Материалы IX Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов "Симбиоз-Россия 2016"*, (Пермь, 04-06.07.2016). – 2016. – С. 64-67. (РИНЦ)
2. **Цыганов И.В.**, Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Новый метод исследования эффекта ограничения скольжения у микроорганизмов // *Высокие технологии, определяющие качество жизни. Материалы 2-й Международной научной конференции (Пермь, 17-19.09.2018).* – 2018. – С. 135-137. (РИНЦ)
3. Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., **Цыганов И.В.**, Ткаченко А.Г. Полиамины как модуляторы антибиотикочувствительности бактерий // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* – 2019. – № 3. – С. 16. (РИНЦ)
4. **Цыганов И.В.**, Максименко Н.А., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Скольжение как индикатор стрессорных состояний микобактерий // *Материалы XI Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием "Симбиоз-Россия 2019"*, (Пермь, 13-15.05.2019). – 2019. – С. 91-93. (РИНЦ)
5. Ткаченко А.Г., Хаова Е.А., Кашеварова Н.М., Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., Сидоров Р.Ю., **Цыганов И.В.** Роль полиаминов в регуляции бактериальной персистенции // *Вестник пермского федерального исследовательского центра.* – 2020. – № 2. – С. 36-47. (РИНЦ)
6. **Цыганов И.В.**, Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Полиамины способствуют изменению поверхностных свойств микобактерий // *Материалы XII Всероссийского конгресса молодых*

ученых-биологов с международным участием "Симбиоз-Россия 2020". (Пермь, 29-30.09.2020). – 2020. – С. 290-293. (РИНЦ)

7. **Tsyganov I.V.**, Tkachenko A.G. Effect of Exogenous Spermine on Biofilm Formation in Mycobacteria by Stimulating the Synthesis of Glycopeptidolipids // BIO Web of conferences. 2023. – V. 57. 02002. (Scopus)

8. **Цыганов И. В.**, Сидоров Р. Ю., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Исследование эффективности эрогоргиана против микобактериальных биопленок в сравнение с противотуберкулезными препаратами первого ряда // Сборник статей всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования». (Пермь, 18-20.10.2021). – 2021. – С. 168-170. (РИНЦ)

9. **Цыганов И. В.**, Сидоров Р. Ю., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Синтетический аналог метаболита морских кораллов подавляет образование биопленок микобактериями // Материалы 3-го Российского микробиологического конгресса (Псков, 26.09-01.10.2021). – 2021. – С. 121. (РИНЦ)

10. **Цыганов И.В.**, Ткаченко А.Г. Участие полиаминов в регуляции скольжения *Mycolicibacterium smegmatis* в присутствии антибиотиков // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: Тезисы докладов второй Всероссийской научной конференции с международным участием, Иркутск, Байкал, (Иркутск, 28.02-06.03.2022). – 2022, – С. 106-109. (РИНЦ)

11. **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. (Иркутск, 03-07.07.2023). – 2023. – С. 80. (РИНЦ)

e-mail автора: zamegagurrendan@gmail.com

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГПЛ – гликопептидолипиды

МБК – минимальная бактерицидная концентрация

МПК – минимальная подавляющая концентрация

МКПБ – минимальная концентрация, подавляющая биоплёнкообразование

ТСХ – тонкослойная хроматография

DAP1 – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DMNP – 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановая кислота

(p)ppGpp – гуанозин пента- тетрафосфат

PolyP – полифосфаты

ЦЫГАНОВ ИВАН ВАДИМОВИЧ

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

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 09.09.2025

Формат 60×90/16. Усл. печ.л. 1.

Тираж 100 экз. Заказ

Набор компьютерный.

Отпечатано в «Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук» – филиале Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского
отделения Российской академии наук

614081, г. Пермь, ул. Голева, 13