

На правах рукописи

Сенягин Александр Николаевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ЛИЗИН- α -
ОКСИДАЗЫ ПРОДУЦЕНТА *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI НА УСЛОВНО –
ПАТОГЕННЫЕ И НЕПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ**

1.5.11. Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный руководитель: Подопригора Ирина Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института, заведующий кафедрой

Официальные оппоненты:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория медицинской бактериологии, заведующий лабораторией

Червинец Юлия Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 года в __ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Антибиотикорезистентность представляет собой одну из наиболее значимых проблем современной медицины (McGuinness W.A. et al., 2017; Nieuwlaat R. Et al., 2021). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 2019 год зарегистрировано более 4,95 миллиона смертей, обусловленных инфекциями, вызванными резистентными микроорганизмами (World Bank and the World Health Organization, 2022). В связи с этим поиск новых противомикробных субстанций является приоритетным направлением для микробиологических лабораторий и научно-исследовательских институтов. В настоящее время значительный интерес вызывают альтернативные противомикробные терапевтические подходы, включающие использование пептидов (Li M.F. et al., 2019), растительных экстрактов (Anand U. et al., 2019; Anand U. et al., 2020) и наночастиц (Gupta A. et al., 2020; Hadrup N. et al., 2020).

Антимикробные пептиды представляют собой низкомолекулярные белковые молекулы, обладающие выраженной антагонистической активностью по отношению к широкому спектру микроорганизмов, включая бактерии, грибы и вирусы (Lima V. et al., 2021). Источниками антимикробных пептидов могут быть как сами микроорганизмы, особенно представители рода *Bacillus*, так и растения, и животные (Li M.F. et al., 2019). Одним из механизмов бактериостатического действия этих субстанций является нарушение синтеза компонентов клеточной стенки бактерий (Li M.F. et al., 2019).

Экстракты растений представляют собой перспективный и эффективный подход борьбы с «супербактериями». Фитохимические соединения, обладающие антимикробной активностью, включают алкалоиды, флавоноиды, хиноны и кумерины (Anand U. et al., 2019; Anand U. et al., 2020). Доказано, что компоненты растительных экстрактов ингибируют способность микроорганизмов формировать биопленки (Bazargani M.M. et al., 2016; Khare T. et al., 2021).

Наночастицы представляют собой наноструктуры размером от 1 до 100 нм, которые в последние годы находят широкое применение в медицине как альтернатива традиционным антибактериальным препаратам. Основные механизмы действия наночастиц включают их способность взаимодействовать с мембраной бактерий, что приводит к нарушению её целостности и последующей гибели клетки, а также их способностью генерировать образование активных форм кислорода (Gupta A. et al., 2020). Однако некоторые исследователи отмечают, что наночастицы могут накапливаться в лимфатических узлах, печени, почках и селезенке, вызывая цитотоксический эффект у лабораторных животных (Hadrup N. et al., 2020).

Несмотря на значительный потенциал вышеупомянутых направлений, поиск антибактериальных субстанций микробного происхождения сохраняет свою актуальность (Gil-Gil T. et al., 2019). Явление антагонизма в микробных сообществах играет ключевую роль в структуре и динамике микробиологических экосистем. Многие бактерии и грибы продуцируют природные химические соединения, обладающие бактериостатическим и бактерицидным эффектом в отношении конкурирующих видов. Например, пенициллины, производимые грибами рода *Penicillium*, широко используются в медицине, а метаболиты других грибов находят применение в сельском хозяйстве для борьбы с фитопатогенами (Коломбет Л.В. et al., 2006; Коломбет Л.В. et al., 2007; Смирнова И.П. et al., 2014). Перспективным метаболитом является фермент L-лизин- α -оксидаза - оксидоредуктаза аминокислоты L-лизина. При протекании реакции окислительного дезаминирования субстрата выделяется α -кето- ϵ -аминокапроновая кислота, Δ^7 -пиперидин-2-карбоновая кислота, аммиак и перекись водорода, которые оказывают противомикробное действие. Кроме того, L-лизин является компонентом в метаболизме аминокислот у некоторых грибов и бактерий, а снижение его концентрации в клетке в ходе окислительного дезаминирования при вступлении в реакцию с L-лизин- α -оксидазой ведет к нарушению метаболизма у многих микроорганизмов (Li M.F. et al., 2019).

Известно, что продуцентами фермента L-лизин- α -оксидазы могут быть не только грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*, но и грибы из рода *Trichoderma*, способные продуцировать и многие другие биологически активные вещества, обеспечивающие конкуренцию за микрoэкологические ниши (Howell C.R. et al., 1998; Antal Z. et al., 2000; Howell C.R. et al., 2003).

Впервые род *Trichoderma* был описан немецким микологом С. Н. Persoon (Persoon C.H. et al., 1794), который охарактеризовал данный гриб как обитателя почвы и разлагающихся растительных остатков. Это открытие стало основой для понимания экологической роли данного микроорганизма. В 1928 году в Индии R. N. Thakur и H. S. Norris (Thakur R.N. et al., 1928) выделили гриб *Trichoderma* из растительного материала, что подтвердило его широкую географическую распространенность и универсальность в различных экосистемах. Грибы рода *Trichoderma* можно изолировать из почв на территории Северной Америки, Европы, Азии, а также многих биомов России, особое разнообразие наблюдается в регионах Сибири (Литовка Ю.А. et al., 2018).

Значительный вклад в понимание свойств рода *Trichoderma* был сделан Робертом Вайнлингом в 1932 году (Weindling R., 1932), который установил, что *Trichoderma lignorum* обладает способностью к микопаразитизму и эффективно подавляет фитопатоген *Rhizoctonia solani*. Это открытие стало основой для дальнейшего изучения биоконтрольного потенциала рода *Trichoderma*. В 1934 году R. Weindling также впервые выделил из гриба *Trichoderma* соединение глиотоксин, обладающее антимикробной активностью, что продемонстрировало значимость этого рода для разработки новых природных антимикробных препаратов.

Классификация рода *Trichoderma* началась с работы М. А. Rifai (Rifai M.A., 1969), который предложил концепцию "агрегатов видов" и определил девять видов на основе морфологических характеристик. В 1991 году J. Bissett (Bissett J., 1991) расширил таксономическую систему, разделив род на пять секций, учитывая не только морфологические, но и физиологические особенности видов. Впоследствии филогенетические исследования, основанные на анализе последовательностей ДНК, существенно углубили таксономическое понимание рода, что позволило идентифицировать новые виды и уточнить их эволюционные взаимосвязи. Так работа I. S. Druzhinina и соавторов (Druzhinina I. S. et al., 2018) предоставила фундаментальные знания о видовом разнообразии и таксономии рода *Trichoderma* (Домен – *Eukaryota*; Царство – *Fungi*; Тип – *Ascomycota*; Класс – *Sordariomycetes*; Порядок – *Hypocreales*; Семейство – *Hypocreaceae*). Работы D. Martinez и соавторов (Martinez D. et al., 2008) стали поворотным моментом в геномных исследованиях и биотехнологическом применении *Trichoderma reesei*, заложив основу для дальнейшего изучения экологии, эволюции и промышленного использования рода *Trichoderma*, направленных на раскрытие его антимикробного потенциала, что способствовало в 1979 году группе японских ученых выделить L-лизин- α -оксидазу при культивировании *Trichoderma viride* Y244 – 2 (Kusakabe H. et al., 1980). Советские ученые смогли изолировать свой штамм продуцента - *Trichoderma harzianum* Rifai - F-180 (Штерншис М. В., 2012).

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время L-лизин- α -оксидаза — это фермент, который активно исследуется в области биологии и медицины. Одной из наиболее хорошо изученных характеристик фермента является его противоопухолевая активность как в отношении мышинных моделей, так и человеческих (Anand U.A. et al., 2019). В 2015 году была продемонстрирована противоопухолевая активность L-лизин- α -оксидазы по отношению к ксенотрансплантатам опухолей толстого кишечника человека, включающих линии НСТ 116, LS174T, T47D (Anand U.A. et al., 2019).

Е. В. Лукашевой был продемонстрирован теоретический ноотропный эффект, оказываемый L-лизин- α -оксидазой, за счет снижения уровней L-лизина и полиаминов в головном мозге (Lukasheva E.V. et al., 2020). Несмотря на столь обширное изучение

противоопухолевой и ноотропной активности L-лизин- α -оксидазы, исследований, направленных на изучение противомикробной активности, мало. Так в 2014 году И. П. Смирнова и И. В. Раковская исследовали действие фермента на микоплазмы - двух видов представителей семейства *Mycoplasmataceae*: *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma fermentans* и одного вида представителя семейства *Aholeplasmataceae*: *Aholeplasma laidlawii* (Smirnova I.P. et al., 2014). В 2016 году этими же исследователями были проведены работы по изучению влияния фермента на вирус клещевого энцефалита человека в условиях *in vitro*, с выявлением подавления репликации вируса в тестируемых клеточных линиях SPEV и Vero, клон Е6 (Smirnova I.P. et al., 2015). Неоднократно исследователями было описано ингибирующее действие L-лизин- α -оксидазы в отношении фитопатогенов, например, в отношении тосповируса (Antal Z. et al., 2000; Howell C.R. et al., 2003; Howell C.R. et al., 1998).

Таким образом, эти данные подтверждают, что фермент L-лизин- α -оксидаза обладает широким спектром биологической активности и может быть полезным инструментом для преодоления глобальной проблемы антибиотикорезистентности.

Цель исследования:

Изучить антагонистическое действие фермента L-лизин- α -оксидазы в отношении условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов.

Задачи исследования.

1. Провести культивирование *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 в лабораторных условиях, установив оптимальные параметры культивирования продуцента, позволяющие получить на выходе максимальную концентрацию L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости продуцента.
2. Усовершенствовать метод определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости, заменив канцерогенный реагент хромогенной смеси орто-дианизидингидрохлорид на безопасный реактив.
3. Выявить спектр действия фермента L-лизин- α -оксидазы в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также в отношении грибов рода *Candida* из порядка *Saccharomycetales*.
4. Выявить антагонистическое действие культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 и гомогенного фермента L-лизин- α -оксидазы в отношении полирезистентных бактерий.
5. Определить степень влияния фермента L-лизин- α -оксидазы на формирование биопленок условно-патогенными бактериями.
6. Определить иммунологические свойства фермента L-лизин- α -оксидазы на биологических моделях.

Научная новизна

Определены оптимальные условия культивирования штамма грибов *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180, включая состав питательной среды, температурный режим, время инкубирования, при которых достигается максимальная продукция и активность фермента L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости.

Усовершенствован метод определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180, путем замены канцерогенного компонента орто-дианизидингидрохлорида на биобезопасный тетраметилбензидин, что позволило не только обеспечить безопасность проведения реакции, но и повысить чувствительность метода.

В результате исследования установлено, что фермент L-лизин- α -оксидаза штамма грибов *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 обладает выраженной антимикробной активностью, в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) фермента L-лизин- α -оксидазы для грамположительных бактерий составила 0,001 г/мл, а для грамотрицательных бактерий 0,01 г/мл. Кроме того, было установлено, что в отношении дрожжевых грибов из порядка *Saccharomycetales* фермент L-лизин- α -оксидаза не проявлял фунгицидной активности.

Выявлено, что фермент L-лизин- α -оксидаза штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 обладает антагонистической активностью в отношении условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов. Показана выраженная способность фермента ингибировать, не только рост микроорганизмов, но и способность к формированию биопленок (от 70 до 100%).

Показано, что концентрат культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 и препарат гомогенного фермента обладают выраженной противомикробной активностью в отношении полирезистентных уропатогенных кишечных палочек (УПКП).

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования антимикробных свойств фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 доказывают перспективность направления по изучению антагонизма в микробных сообществах и поиску новых антибактериальных субстанций микробного происхождения, обладающих выраженным антагонистическим действием, как одного из приоритетных направлений стратегии борьбы с антибиотикорезистентностью.

Потенциальное использование фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 в сочетании с антибиотиками или постбиотиками открывает новые горизонты в разработке комбинированных стратегий лечения инфекций, вызванных полирезистентными патогенами.

При изучении *in vitro* и *in vivo* определено, что иммунологические свойства, включая сенсibiliзирующую активность, исследуемого фермента сопоставимы с таковыми у зарегистрированных ферментных препаратов, что обосновывает перспективность последующей разработки на основе фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 новых лекарственных препаратов с антибактериальной активностью.

Возможность ингибирования биопленок с использованием фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 позволяет применять его для создания антимикробных покрытий на поверхностях медицинских изделий, таких как катетеры, эндопротезы, хирургические инструменты, что будет способствовать предотвращению инфекционных осложнений, вызванных микроорганизмами, формирующими биопленки.

Низкий уровень аллергенности фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 (анафилактический индекс - $1,3 \pm 0,2$) обосновывает его безопасность для клинического применения, создавая предпосылки для разработки инновационных терапевтических препаратов с минимальными побочными эффектами.

Определены перспективы использования фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 для создания средств в местной терапии, направленных на заживление инфицированных ран, предотвращение септических осложнений и лечение язвенных поражений.

Усовершенствованный метод определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 позволяет проводить качественное и количественное индикацию его наличия в культуральной жидкости продуцента с анализом его иммунологических свойств

Результаты диссертационного исследования используются в учебно-методических материалах кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института ФГАОУ РУДН им. Патриса Лумумбы при подготовке студентов по специальности «Лечебное дело», «Стоматология», «Фармация» в рамках дисциплин: «Микробиология, вирусология», «Микробиология, вирусология – полости рта», «Микробиология» и в учебно-методических

материалах кафедры микробиологии и вирусологии Института профилактической медицины им. З. П. Соловьева ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России при подготовке студентов по специальности «Лечебное дело», «Стоматология», «Педиатрия», «Фармация» (акт внедрения от 26 сентября 2024 года ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы и акт внедрения от 3 октября 2024 года ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России).

Методология диссертационного исследования

Методологическая основа диссертационного исследования была спланирована на основании поставленной цели и включает применение методов научного познания с целью решения поставленных задач. Применялись следующие методы исследования: классические бактериологические, микроскопические, биотехнологические, биохимические, молекулярно-генетические, иммунологические, культуромные и фенотипические методы определения устойчивости к антибиотикам.

Организация и проведение диссертационного исследования одобрены этической экспертизой Комитета по Этике Медицинского института РУДН от 21 февраля 2019 года, выписка из протокола №6, выписка из протокола №29 от 20 июня 2024.

Материалы и методы исследования

Штаммы микроорганизмов

В работе были использованы типовые штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Escherichia coli* ATCC 2582, *Candida albicans* ATCC 10231, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC, США).

Штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также дрожжевых грибов рода *Candida* были получены из рабочей коллекции кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»:

1. Грамположительные бактерии: *Staphylococcus aureus* 4785, *Staphylococcus simulans* 5882, *Streptococcus hominis* 19, *Streptococcus agalactiae* – 3984, *Streptococcus mutans* 21, *Kocuria rhizophila* 1542, *Lactobacillus acidophilus* NK 1, *Limosilactobacillus fermentum* 219073, *Enterococcus faecalis* 5960, *Enterococcus avium* 1669.

2. Грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli* - M17; *Klebsiella pneumoniae* 1449, *Klebsiella oxytoca* 3003, *Enterobacter cloacae* 15 6392, *Achromobacter xylosoxidans* 4892, *Acinetobacter baumannii* 5841, *Citrobacter freundii* 426, *Moraxella catarrhalis* 4222, *Morganella morganii* 1543, *Proteus mirabilis* 1543, *Pseudomonas aeruginosa* 3057, *Serratia marcescens* 6441.

3. Грибы из порядка *Saccharomycetales*: *Candida albicans* subsp.

Полирезистентные уропатогенные кишечные палочки, в количестве 70 штаммов, были получены из рабочей коллекции кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»: *Escherichia coli* subsp. – 70 штаммов.

Биологические модели млекопитающих

Для определения иммунологических свойств были выбраны следующие модели млекопитающих: мыши линий СВА (СВА х С₅₇В1, SHR), морские свинки породы «Агути» и кролики породы «Советская шиншилла».

Клеточные линии

Клеточная линия эпителиальных клеток африканской зеленой мартышки Vero E6 была предоставлена ведущим научным сотрудником лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ д.м.н. В. Ф. Ларичевым.

Методы исследования

Культуральные методы

Культивирование продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180, для получения фермента, проводили на среде Сода в смешанном режиме аэрации, в течение 12 дней на шейкер – инкубаторе (Heidolph Unimax 1010, Германия) при температуре 27±1°C и 80 rpm.

Исследуемые микроорганизмы культивировали на средах: сердечномозговой бульон (HiMedia M210, Индия); MRS – бульон для лактобактерий (HiMedia M369, Индия); Сабуро бульона с глюкозой (HiMedia M033, Индия) для дрожжевых грибов рода *Candida*. При соблюдении следующих условий: в течение 24 часов и более, температура - 37°C (Incubator Being, КНР); для микроаэрофильных микроорганизмов создавали микроаэрофильные условия при помощи газогенераторных пакетов (BBL GasPak microaerophilic system envelopes, DIFCO, США).

Выделение и очистка фермента L-лизин- α -оксидазы

Полученную, в ходе ферментации, культуральную жидкость продуцента, в последующем очищенную от грубых частиц, остатков мицелия продуцента и спор, сепарировали на ультрафильтрационных мембранах (Millipore, Франция) в целях выделения искомой фракции, содержащей исследуемый фермент были использованы ультрафильтрационные мембраны XM300 (> 300,000 MW; Millipore XM300 quantily – 25, Франция), XM150 (150 000 MW; Millipore XM150 quantily – 25, Франция), UM20E (>15-25,000 MW; Millipore UM20E quantily – 25, Франция). Для визуального контроля наличия искомого фермента в культуральной жидкости производили при помощи электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием денатурирующего раствора.

Определение антагонистического действия фермента L-лизин- α -оксидазы и концентрата культуральной жидкости по отношению к избранным микроорганизмам

Оценку антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы и концентрата культуральной жидкости по отношению к избранным микроорганизмам лунко – диффузионным методом проводили, ориентируясь на критерии Европейского комитета по определению 25 чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, версия 14.0). Опытные концентрации фермента: 0,1 г/мл; 0,75 г/мл; 0,5 г/л; 0,25 г/мл; 0,01 г/мл; 0,001 г/мл; 0,0001 г/мл. В качестве отрицательного контроля был выбран физиологический раствор хлорида натрия (0,9% NaCl, Helicon, Россия), а в качестве положительного контроля – тест - диск с фосфомицином (FO200, 200 мкг/диск/ HiMedia, Индия).

Определение биопленкообразования микроорганизмами и подавления биопленкообразования L-лизин- α -оксидазой и концентратом культуральной жидкости методом микропланшетного культивирования

В лунки стерильного полистеролового 96-луночного планшета (NEST, КНР) вносили среду Мюллера – Хинтона бульон (HiMedia M391, Индия) с добавлением глюкозы до 1% объемом – 180 мкл. Далее вносили ранее подготовленный инокулят культуры объемом 20 мкл (разведение 1/10). В опытные лунки, на начальном этапе эксперимента, на 24 часа от начала и на 48 часов, для определения подавления процесса биопленкообразования L-лизин- α -оксидазой, вносили 20 мкл L-лизин- α -оксидазы (конечная концентрация в лунке равнялась 100 мкг / мл) или 20 мкл концентрата культуральной жидкости. Планшеты инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов при температуре 37°C. Визуализацию проводили при помощи 1% раствор кристаллического – фиолетового (ЧДА, ЛенРеактив, Россия) с фиксацией результата на планшетном ридере (AllSheng Feyond – A300, КНР) при длине волны 492 нм.

Исследование влияния L-лизин- α -оксидазы на биопленкообразование при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Для выявления морфологии биопленок исследуемых микроорганизмов при росте на плотной среде в присутствии концентрата культуральной жидкости или раствора L-лизин- α -оксидазы использовали метод, описанный далее. L-лизин- α -оксидазу или концентрат культуральной жидкости вносили в объеме 10 мл в 90 мл (1:10) расплавленного агара Мюллера-Хилтона (HiMedia M173, Индия) с добавлением 1% раствора глюкозы (температура среды 45°C, для исключения денатурации и инактивации фермента). Полученную среду разливали в чашки Петри по 20 мл. На поверхность застывшего агара раскладывали мембранные фильтры (диаметр пор 0,22 мкм, Millipore, Франция), с

последующим нанесением взвеси исследуемых микроорганизмов в концентрации равной 0,5 McFarland (HiMedia, Индия). Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 48 часов. Исследование морфологии биопленок микроорганизмов проведено на сканирующем электронном микроскопе Mira (Tescan, Чехия) с использованием детекторов отраженных и вторичных электронов. Ускоряющее напряжение 5-8 кВ, ток пучка составлял 2,5-7 нА.

Определение и оценка цитотоксического действия L-лизин- α -оксидазы на культуру клеток Vero E6

Двукратные рабочие разведения готовили в 24-луночных планшетах путем титрования с шагом 2 на среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия), начиная с концентрации 640 мкг/мл. Полученные разведения L-лизин- α -оксидазы переносили в 96-луночный планшет с подготовленной клеточной культурой в объеме 200 мкл.

Краткий дизайн исследования

Общий план и последовательность проведения диссертационного исследования схематически визуализированы на рисунке 1.

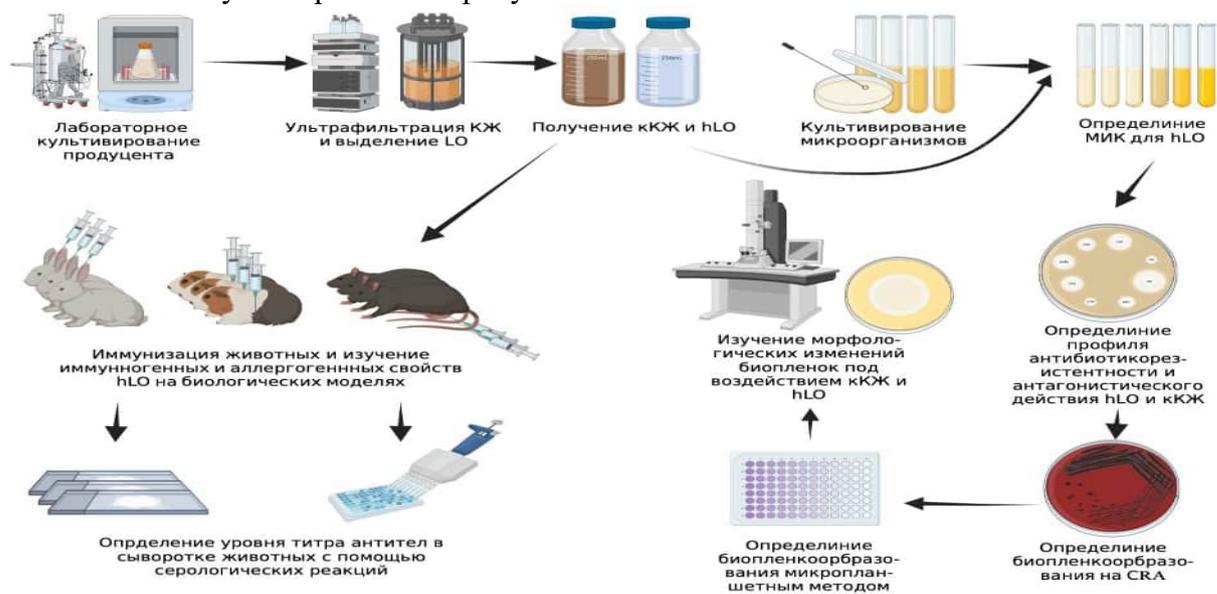


Рисунок 1 – Краткий дизайн, отображающий ключевые этапы и методы исследования
Примечание: КЖ - культуральная жидкость, LO - L-лизин- α -оксидаза, кКЖ - концентрат культуральной жидкости, МИК-минимальная ингибирующая концентрация, hLO - гомогенный фермент L-лизин- α -оксидаза, CRA-конго-красный агар.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась параметрическими и непараметрическими методами вариационной статистики с использованием программных пакетов: Past (ver. 4.03), XLSTAT (Premium v2016.02.28451) и RStudio v.1.6.0. (R ver. 4.3.2.). Статистический анализ количественных и качественных признаков проводился согласно критериям Стьюдента (t – критерий), Фишера (f – критерий), Манна – Уитни (U – критерий) и критерий согласия Пирсона (хи – квадрат). Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$ (M-среднее арифметическое, m-стандартное отклонение), медианы и межквартильного размаха.

Личное участие втора в получении результатов

Автор лично участвовал в выборе темы исследования, формулировке цели и задач исследования. Автором выполнены микробиологические методы культивирования микроорганизмов и подготовка культуры к проведению исследований, описанных в диссертационной работе. Произведены исследования образования культурами микроорганизмов биопленок и их подавления. Проведена генетическая идентификация микроорганизмов и математически – статистический анализ полученных данных. Совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории биологии и индикации

арбовирусом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ д.м.н. В. Ф. Ларичевым и заслуженным профессором РУДН кафедры биохимии имени академика Т. Т. Берёзова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» д.б.н. И. П. Смирновой разработан новый и безопасный метод определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы. Совместно с ассистентом кафедры общей патологии имени В. М. Коропова Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина к.б.н. А. Ю. Арсенюк проведено исследование изменения структуры биопленки микроорганизмов под воздействием L-лизин- α -оксидазы и подготовлены микрофотографии электронной микроскопии. Совместно с профессором РУДН кафедры биохимии имени академика Т. Т. Берёзова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» д.б.н. И. П. Смирновой проведены иммунологические исследования фермента.

Автор обобщил полученные результаты исследования, научно обосновал выводы и представил результаты работы на научно-практических конференциях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Подобраны оптимальные условия культивирования штамма гриба вида *Trichoderma harzianum* Rifai F-180, обеспечивающие высокую продукцию фермента L-лизин- α -оксидазы в лабораторных условиях. Усовершенствован экспресс-метод определения активности и концентрации фермента, предусматривающий замену канцерогенного ортоданизидингидрохлорида на тетраметилбензидин.
2. L-лизин- α -оксидаза обладает широким спектром антимикробного действия в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Ингибирующее действие фермента L-лизин- α -оксидазы на формирование биопленок условно-патогенными и непатогенными микроорганизмами проявляется только при обработке тестовой культуры ферментом на ранних этапах ее роста и формирования биопленки.
3. Фермент L-лизин- α -оксидаза не обладает выраженной иммунологической активностью, что подтверждает его перспективность для применения в медицинской микробиологии и разработке антимикробных препаратов

Степень достоверности полученных результатов

Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом проведенных исследований, применением современных методов и подходов исследования, а также методов статистической обработки данных, которые соответствуют поставленным задачам.

Материалы диссертационного исследования были апробированы на заседании кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов 30 имени Патриса Лумумбы» (выписка из протокола № 030017-04/05 от 05.12.2024 года).

Работа выполнена в рамках НИР медицинского института ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы «Низкомолекулярные сигнальные вещества (quorum sensing) микробного происхождения, как модуляторы чувствительности микроорганизмов к химиопрепаратам» (номер государственной регистрации: 031622-0-000).

Материалы диссертационного исследования представлены и обсуждены на Российских и зарубежных научно-практических конференциях: FEBS Open Bio 2019 (Krakow, Poland, July 6 – 11, 2019); «Молекулярные Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» МобиХим – Фарма (Россия, г. Судак, 15 – 18 сентября 2019 года); XXIII Кашкинские чтения (Россия, г. Санкт – Петербург, НИИ Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина, 9 – 11 ноября 2020 года); FEBS Open Bio 2021 (Ljubljana, Slovenia, July 3 – 8 2021 года); «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспертизы сырья и продуктов животного происхождения» (г. Москва, 8 ноября 2022 года); XXVII Всероссийская Пироговская научная медицинская конференция

студентов и молодых ученых (Россия, г. Москва, 2023 года); XXVI Кашкинские чтения (Россия, г. Санкт – Петербург, НИИ Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина, 7 – 9 июня 2023 года).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности: 1.5.11. Микробиология п.7 «Свойства отдельных видов микроорганизмов, как патогенных, так и населяющих организм человека, а также видов, используемых в качестве пробиотиков и продуцентов биотехнологических продуктов.» п.11 «Закономерности биосинтеза антибактериальных субстанций бактериального происхождения (антибиотики и бактериоцины), молекулярные механизмы чувствительности бактерий к антибиотикам, методы фенотипического и генотипического исследования механизмов лекарственной устойчивости, фундаментальные основы их преодоления».

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых изданиях, 5 – в материалах конференции.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 167 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 7-ми глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка использованной литературы, включающего 202 источника (10 отечественных и 192 зарубежных). Работа иллюстрирована 16 таблицами и 39 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Культивирование продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 и продукция L-лизин- α -оксидазы

В ходе исследования было установлено, что оптимальные условия для культивирования продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 следующие: температура культивирования $+27,0 \pm 1,0$ °C; pH среды – 6,7- 7,1; в условиях атмосферного воздуха, при смешанном культивировании, с постоянным перемешиванием среды и числом оборотов в минуту 80-120 rpm; продолжительность культивирования - от 5 до 12 дней, максимальная концентрация и активность фермента определяется на 11-12 сутки, при более длительном культивировании концентрация и активность снижаются до нуля.

Усовершенствование метода определения активности L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости

В рамках диссертационной работы была улучшена хромогенная смесь для измерения активности LO в культуральной жидкости штамма *Trichoderma harzianum* Rifai – 180 (Таблица 1). Были определены оптимальные условия для проведения реакции: температура инкубации смеси, уровень pH, объем культуральной жидкости продуцента и объем пероксидазы хрена в реакционной смеси.

Таблица 1 – Сравнение составов реакционных сред оригинального и модифицированного метода определения активности фермента LO в культуральной жидкости продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai – 180

Оригинальный метод определения активности		Модифицированный метод определения активности	
Фосфатный буфер (ФБ), pH 5,9	0,7 мл	Цитратно-фосфатный буфер (ЦФБ), pH 5,0	0,7 мл
L-лизин	0,1 мл	L-лизин	0,1 мл
Орто-дианизидингидрохлорид (ОДГ)	0,05 мл	Тетраметилбензидин (ТМБ)	0,05 мл
КЖ <i>Trichoderma harzianum</i>	0,1 мл	КЖ <i>Trichoderma harzianum</i>	0,1 мл
Пероксидаза хрена	0,05 мл	Пероксидаза хрена	0,05 мл

Согласно полученным в ходе экспериментальной части результатам, оптимальные показатели проведения реакции, следующие: pH реакционной среды – 4,7 – 4,8, температура инкубации – 37⁰С, объем вносимой культуральной жидкости – 0,1 мл, объем вносимой пероксидазы хрена – 0,05 мл.

Активность фермента LO в КЖ была определена в референтных значениях равных 0,54 – 0,58 Ед/мг согласно описанному методу. Активность LO в кКЖ определена в диапазоне 2,84 – 2,88 Ед/мл. Для очищенного фермента LO, выделенного с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии из культуральной жидкости продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai – 180, активность была определена в значениях равных 50,0 – 50,3 Ед/мг.

Определение спектра антагонистического действия гомогенного фермента L-лизин- α -оксидазы по отношению к тестируемым бактериальным культурам и штаммам сравнения лунко – диффузным методом

Определение чувствительности избранных штаммов непатогенных и условно – патогенных микроорганизмов к LO проводились по модифицированному методу Кирби – Бауэра. В эксперименте исследуемый фермент был в следующих концентрациях: 0,1; 0,075; 0,05; 0,025; 0,01; 0,001; 0,0001 г/мл. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Зоны ингибирования роста (мм) исследуемых микроорганизмов при внесении L-лизин- α -оксидазы

Зависимость эффективности от концентрации гомогенного фермента в растворе							
Микроорганизм, штамм	Концентрация фермента (А = 50 Ед/мг) в растворе г/мл						
	0,1	0,075	0,05	0,025	0,01	0,001	0,0001
<i>S. aureus</i> 4785	21 ± 1.3	19 ± 1.14	16 ± 0.44	13 ± 0.75	12 ± 0.63	7 ± 0.41	0
<i>S. simulans</i> 5882	21 ± 0.51	18 ± 0.54	16 ± 0.83	13 ± 0.63	9 ± 0.37	7 ± 0.44	0
<i>S. hominis</i> 19	18 ± 0.44	16 ± 0.83	13 ± 0.77	12 ± 0.54	12 ± 0.63	6 ± 0.45	0
<i>S. agalactiae</i> 3984	18 ± 0.71	15 ± 0.89	13 ± 0.84	12 ± 0.54	10 ± 0.77	8 ± 0.44	0
<i>S. mutans</i> 21	23 ± 0.77	19 ± 0.71	14 ± 0.54	13 ± 0.44	13 ± 1.14	7 ± 0.45	0
<i>K. rhizophila</i> 1542	17 ± 0.71	14 ± 0.95	13 ± 0.69	10 ± 1.07	7 ± 0.97	5 ± 0.74	0
<i>L. acidophilus</i> NK - 1	18 ± 0.97	16 ± 0.89	13 ± 0.83	11 ± 0.88	10 ± 0.5	8 ± 0.83	0
<i>L. fermentum</i> 219073	24 ± 0.91	20 ± 0.83	18 ± 0.71	15 ± 0.75	14 ± 0.66	6 ± 0.64	0
<i>E. faecalis</i> 5960	14 ± 0.44	12 ± 0.45	10 ± 0.75	8 ± 0.44	6 ± 0.77	0	0
<i>E. avium</i> 1669	14 ± 0.51	14 ± 0.44	12 ± 0.89	10 ± 0.83	7 ± 0.89	0	0
УПКП (<i>E. coli</i> subsp.)	13 ± 2.48	9 ± 1.87	7 ± 1.6	6 ± 1.16	6 ± 0.68	0	0
<i>E. coli</i> M17	14 ± 1.03	10 ± 1.07	9 ± 0.97	9 ± 0.82	8 ± 0.97	0	0
<i>K. pneumoniae</i> 1449	13 ± 1.05	10 ± 0.71	8 ± 0.81	6 ± 0.87	0	0	0
<i>K. oxytoca</i> 3003	13 ± 0.7	12 ± 0.83	10 ± 1.14	7 ± 0.83	6 ± 0.89	0	0
<i>E. cloacae</i> 6392	12 ± 0.54	11 ± 0.63	11 ± 1.14	8 ± 0.89	0	0	0
<i>A. xylosoxidans</i> 4892	14 ± 0.71	12 ± 0.54	11 ± 0.51	7 ± 0.89	0	0	0
<i>A. baumannii</i> 5841	16 ± 0.63	15 ± 0.44	13 ± 0.71	9 ± 0.71	7 ± 0.44	0	0
<i>C. freundii</i> 426	13 ± 0,54	12 ± 0.89	10 ± 0.55	8 ± 0.44	5 ± 0.71	0	0
<i>M. catarrhalis</i> 4222	12 ± 0.89	11 ± 1.14	9 ± 0.44	7 ± 0.75	6 ± 0.54	0	0
<i>M. morgani</i> 1543	13 ± 0.45	12 ± 0.71	10 ± 0.83	7 ± 0.89	6 ± 0.45	0	0

Продолжение таблицы 2

<i>P. mirabilis</i> 1543	14 ± 0.71	13 ± 0.44	11 ± 1.0	8 ± 0.84	6 ± 0.89	0	0
<i>P. aeruginosa</i> 3057	11 ± 0.77	10 ± 0.54	8 ± 1.0	6 ± 0.89	0	0	0
<i>S. marcescens</i> 6441	12 ± 0.54	11 ± 0.89	9 ± 0.44	7 ± 1.0	0	0	0
<i>C. albicans</i> subsp.	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATTC 6538	20 ± 0.75	18 ± 0.54	14 ± 0.89	12 ± 0.63	10 ± 0.83	6 ± 0.49	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14 ± 0.71	13 ± 0.86	13 ± 0.64	10 ± 0.53	7 ± 0.7	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0	0	0	0	0	0	0

Было установлено, что антагонистическое действие hLO более выражено по отношению к грамположительным, чем к грамотрицательным бактериям. При воздействии на контрольные штаммы микроорганизмов *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* 6538 hLO (в концентрации 0,1 г/мл) вызвал образование зон задержки роста с $d=14 \pm 0.71$ мм и 20 ± 0.75 мм соответственно. Средний диаметр зоны задержки роста, при концентрации вносимого фермента 0,1г/мл для грамположительных микроорганизмов составил $18,0 \pm 3,26$ мм, для грамотрицательных – $13,0 \pm 1,23$ мм.

Следует отметить, что для дрожжевых грибов рода *Candida* минимальную ингибирующую концентрацию и чувствительность по отношению к hLO определить не удалось.

Оценка антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы на полирезистентные УПКП

Согласно полученным данным из 70 штаммов УПКП: 45 штаммов УПКП оказались устойчивы к амоксиклаву (30 мкг/диск); 41 штамм УПКП резистентен к ампициллину (25 мкг/диск) и 31 штамм УПКП не чувствителен к цефазолину (30 мкг/диск). 46 штаммов УПКП из 70 исследованных являлись полирезистентными (резистентны к 3 и более антибактериальным препаратам).

В работе была исследована антагонистическая активность hLO (50,0 Ед/мг) и кКЖ (2,86 – 2,88 Ед/мг) по отношению к 70 штаммам УПКП. Результаты представлены на рисунке 2.

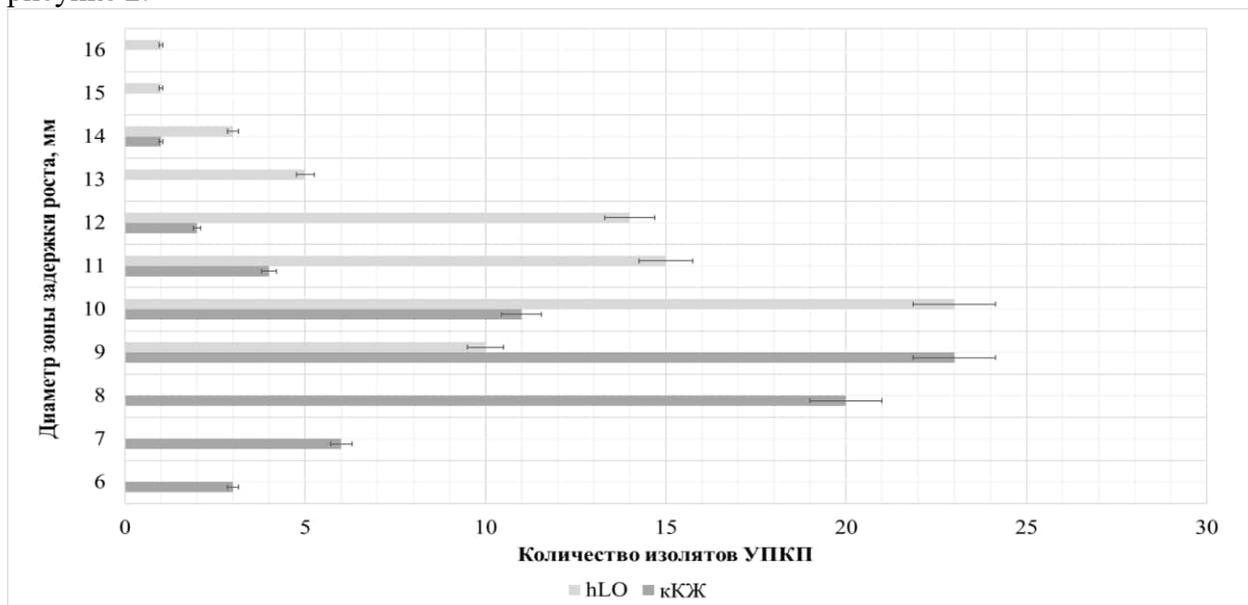


Рисунок 2 – Распределение чувствительности штаммов УПКП по отношению к гомогенному ферменту L-лизин- α -оксидаза (hLO) и концентрату культуральной жидкости (кКЖ) *Trichoderma harzianum* Rifai – 180

Из рисунка 2 видно, что максимальное значение диаметра зоны задержки роста 16 мм было вызвано hLO (50,0 Ед/мг) и только по отношению к одному штамму УПКП. При этом у 23 штаммов УПКП hLO вызывал диаметр зоны задержки роста равный 10 мм, у 15 штаммов – 11 мм и у 14 штаммов - 12 мм. В тоже время действие кКЖ (2,86 – 2,88 Ед/мг) на штаммы УПКП оказалось менее выраженным: 11 штаммов УПКП - 10 мм, 4 штамма - 11 мм и 2 штамма - 12 мм.

Определение влияния L-лизин- α -оксидазы на процесс биопленкообразования у микроорганизмов методом микропланшетного культивирования

Для определения способности к биопленкообразованию тестируемые микроорганизмы культивировали в микропланшетах в течение 72 часов. Затем, согласно стандартному протоколу, лунки в микропланшетах отмывали от планктонных клеток, окрашивали образовавшиеся на дне лунок биопленки, инкубировали, отмывали от несвязавшегося с биопленкой красителя и с помощью 96% этилового спирта экстрагировали краситель из биопленки. Интенсивность окрашивания биопленки оценивали путем измерения значения оптической плотности, при длине волны 492 нм. Результаты для каждого тестируемого микроорганизма представлены на рисунке 3.

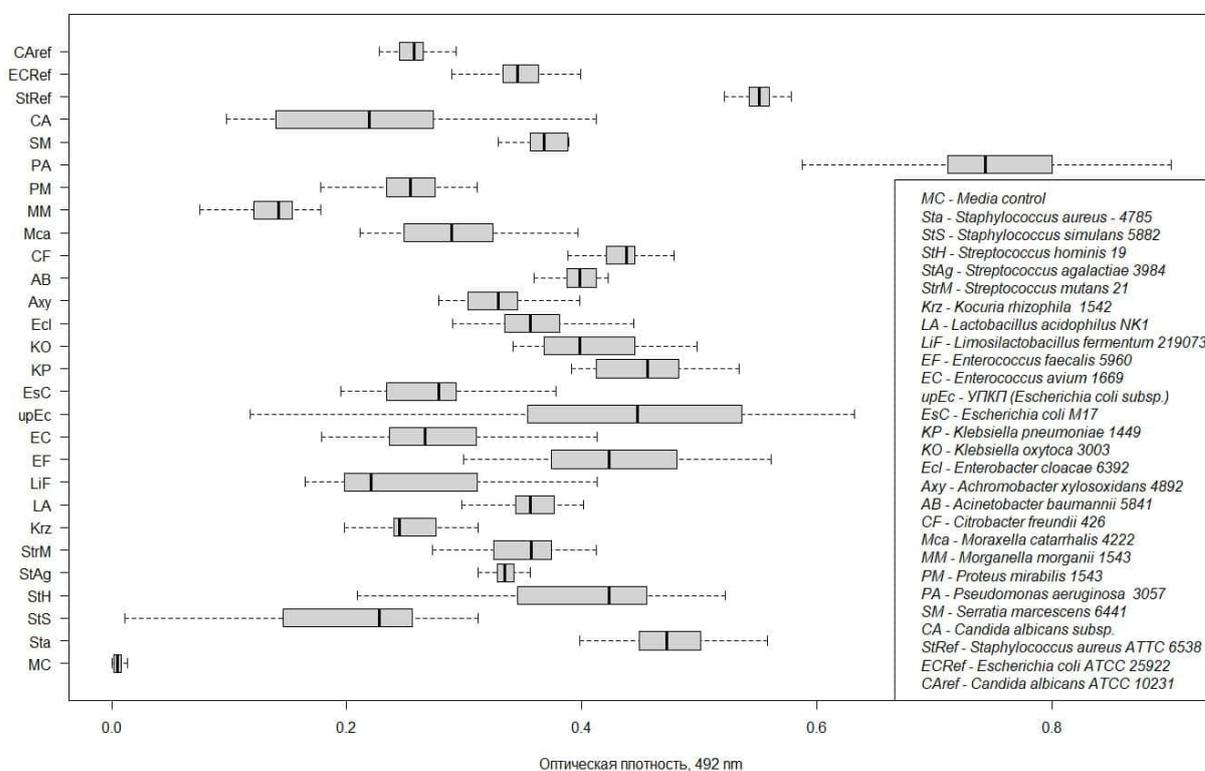


Рисунок 3 – Степень способности к биопленкообразованию у тестируемых микроорганизмов

Примечание: MC – контроль среды, StA – *Staphylococcus aureus* 4785, StS – *Staphylococcus simulans* 5882, StH – *Streptococcus hominis* – 19, StAg – *Streptococcus agalactiae* – 3984, StrM – *Streptococcus mutans* – 21, Krz – *Kocuria rhizophila* 1542, LA – *Lactobacillus acidophilus* - NK – 1, LiF – *Limosilactobacillus fermentum* – 219073, EF – *Enterococcus faecalis* 5960, EC – *Enterococcus avium* 1669, upEc – УПКП (*Escherichia coli* subsp.), EsC – *Escherichia coli* - M17, KP – *Klebsiella pneumoniae* 1449, KO – *Klebsiella oxytoca* 3003, Ecl – *Enterobacter cloacae* 6392, AXy – *Achromobacter xylosoxidans* 4892, AB – *Acinetobacter baumannii* 5841, CF – *Citrobacter freundii* 426, Mca – *Moraxella catarrhalis* 4222, MM – *Morganella morganii* 1543, PM – *Proteus mirabilis* 1543, PA – *Pseudomonas aeruginosa* 3057, SM – *Serratia marcescens* 6441, CA – *Candida albicans* subsp., StRef – *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, ECREf – *Escherichia coli* ATCC 25922, CAREf – *Candida albicans* ATCC 10231

Следовательно, наиболее эффективным ($>0,5$, при длине волны 492 нм) образованием биопленок обладают такие микроорганизмы, как *P. aeruginosa* 3057 ($M = 0,739 \pm 0,135$) и *S. aureus* ATTC 6538 ($M = 0,551 \pm 0,135$). Несмотря на то, что микроорганизмы *E. faecalis* 5960 ($M=0,421\pm0,069$), *E. avium* 1669 ($M=0,278\pm0,060$), *E. cloacae* 6392 ($M=0,359\pm0,038$), *K. oxytoca* 3003 ($M=0,426\pm0,169$), *M. catarrhalis* 4222 ($M = 0,290 \pm 0,079$), *M. morgani* 1543 ($M = 0,140 \pm 0,033$), *P. mirabilis* 1543 ($M = 0,251 \pm 0,031$), *S. aureus* – 4785 ($M = 0,479 \pm 0,039$), *S. simulans* 5882 ($M = 0,210 \pm 0,087$), *S. hominis* - 19 ($M = 0,365 \pm 0,139$), *S. agalacticae* - 3984 ($M = 0,329 \pm 0,055$), *S. mutans* - 21 ($M = 0,352 \pm 0,038$), *Candida* spp. ($M = 0,219 \pm 0,089$), по сравнению с *P. aeruginosa* 3057 и *S. aureus* ATTC 6538 показали менее выраженные результаты, также обладают способностью к образованию биопленки, что подтверждается данными научной литературы.

Влияния L-лизин- α -оксидазы на процесс биопленкообразования у тестируемых микроорганизмов

Влияние hLO и кКЖ на процесс биопленкообразования оценивали с помощью микропланшетного метода и стандартного протокола. Полученные результаты отражены на рисунке 4 и свидетельствуют о том, что hLO подавляет биопленкообразование у большинства тестируемых микроорганизмов.

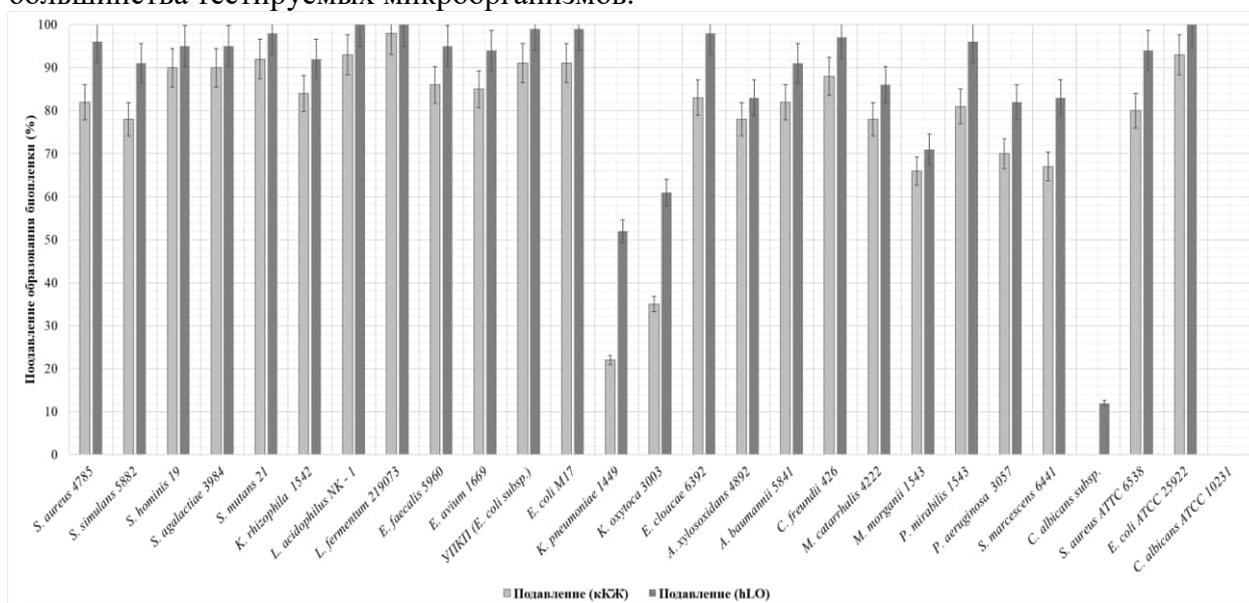


Рисунок 4 – Эффективность подавления биопленкообразования у тестируемых микроорганизмов при внесении кКЖ и hLO в питательную среду на этапе инокуляции культуры

Высокий процент подавления биопленкообразования был характерен только при внесении образцов фермента на ранних этапах формирования биопленки (от начала эксперимента до 24 часа культивации).

Следовательно, ингибирующее действие кКЖ и hLO на подавление биопленкообразования у практически всех микроорганизмов, наиболее выраженный эффект (до 100%) был выявлен в отношении УПКП и представителей родов *Streptococcus* и *Staphylococcus* при внесении образцов фермента на ранних этапах формирования биопленки (от начала эксперимента до 24 часа культивации).

Анализ влияния концентрата культуральной жидкости и L-лизин- α -оксидазы на образование биопленок и их структурные изменения с помощью сканирующей электронной микроскопии

Воздействие LO на формирование биопленок было изучено при внесении hLO и кКЖ в питательные среды. Установлено, что кКЖ продуцента *T. harzianum* Rifai F-180

стимулирует продукцию межклеточного матрикса, выявленного на поверхности *S. aureus* (Рисунок 5) и *E. faecalis* (Рисунок 6).

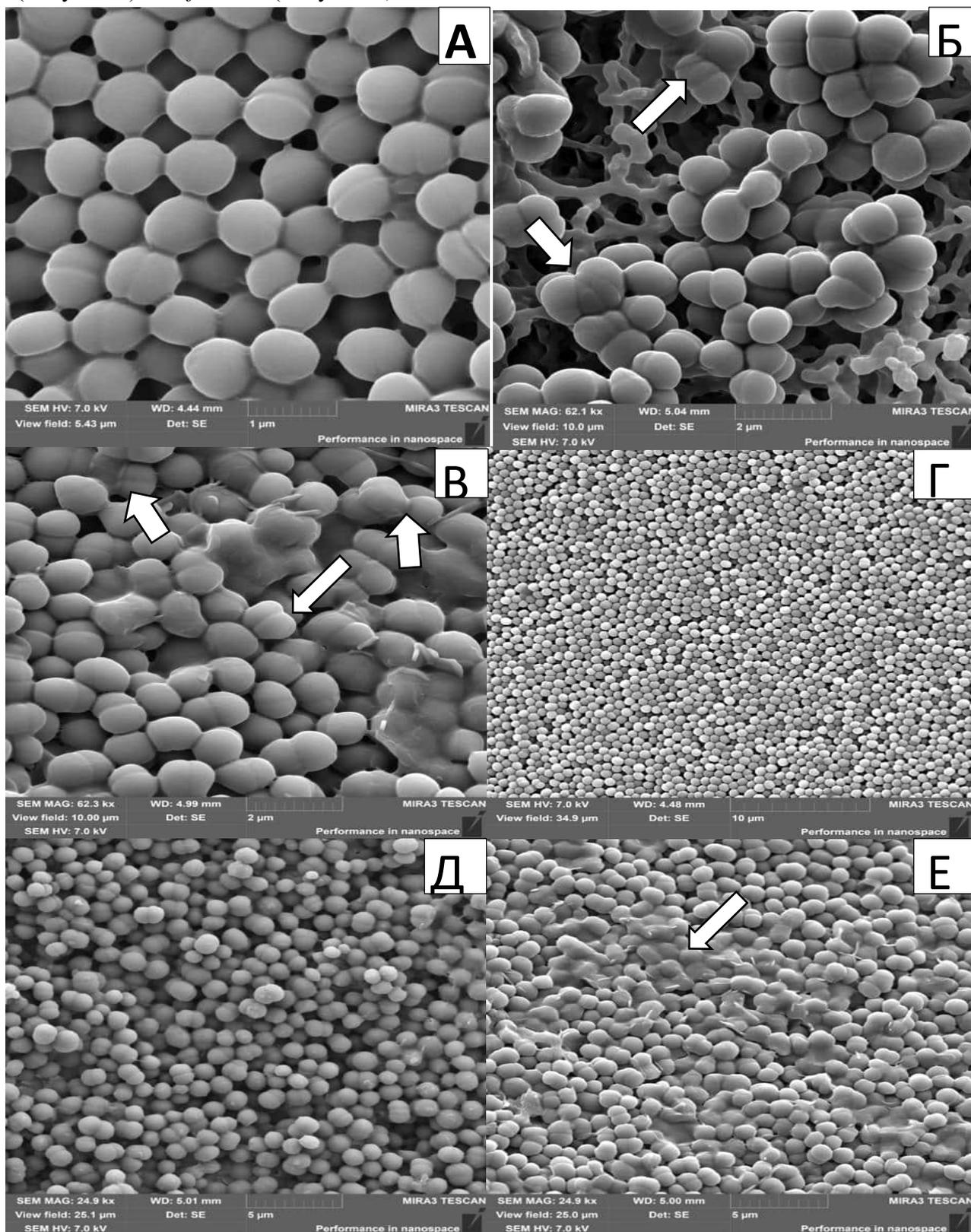


Рисунок 5 – Фрагменты био пленки *S. aureus* (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия) (Увеличение: А – 100.0 кх, Б – 62.1 кх, В – 62.3 кх, Г – 12.5 кх, Д – 24.9 кх, Е – 24.9 кх)

Примечание: А, Г – контроль; Б, Д – воздействие кКЖ; В, Е – воздействие hLO

После воздействия LO на *E. faecalis* в единичных случаях установлены нарушения деления клеток, отмечено появление сочленений в местах расхождения делящихся

бактерий. В то же время при исследовании морфологии *K. pneumoniae* установлено уменьшение продукции межклеточного матрикса, полностью закрывающего бактерии в контрольных образцах. На поверхности отдельных бактерий отмечена «зернистость».

На рисунке 5 (Б, Д) продемонстрирована повышенная продукция межклеточного матрикса под действием кКЖ в сравнении с контролем (А, Г). Также были визуализированы дефекты деления клеток (неполностью разделенные клетки, нетипичная форма клетки) и клеточных стенок (В, Е) *S. aureus* под воздействием LO.

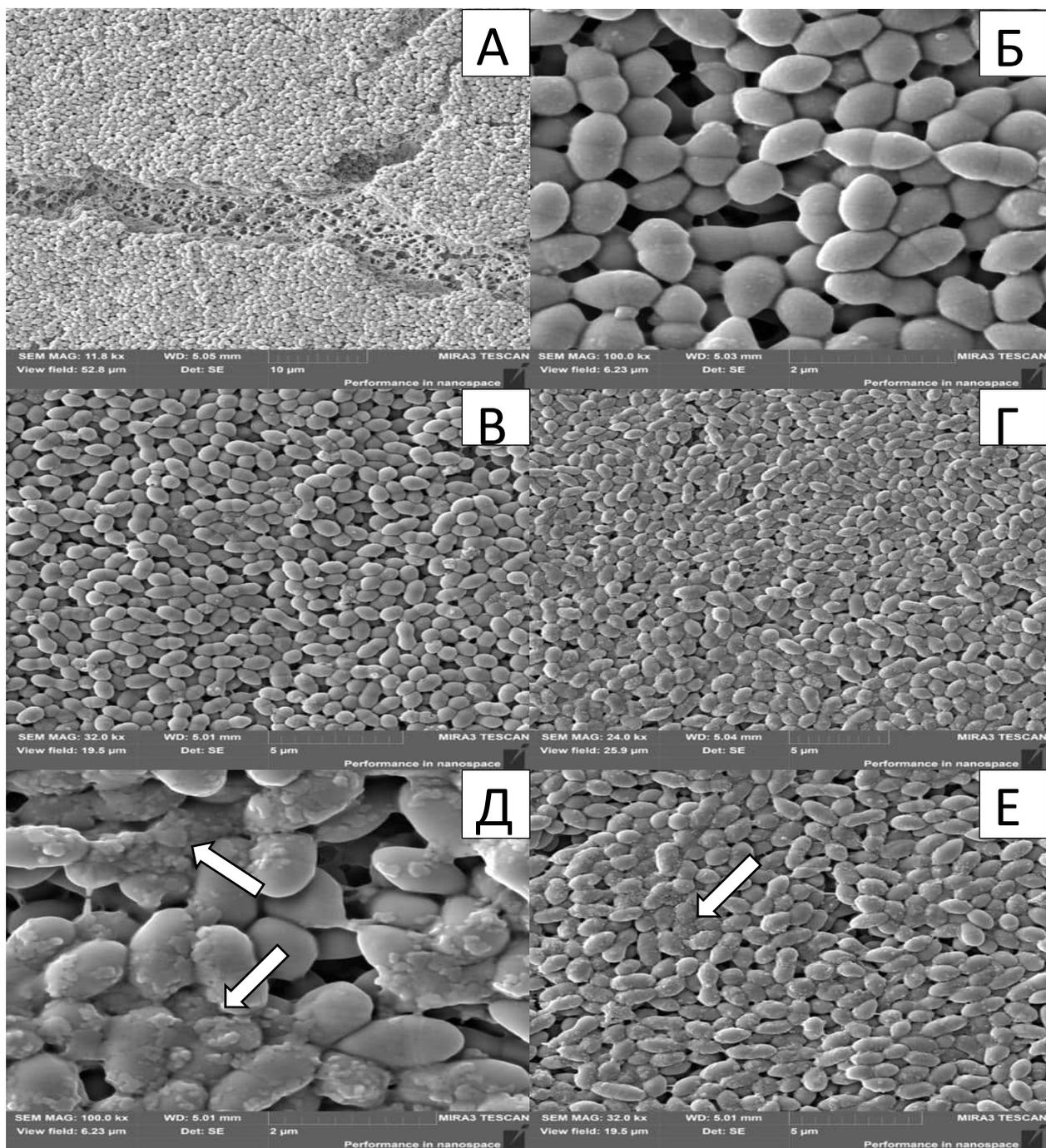


Рисунок 6 – Фрагменты био пленки *E. faecalis* (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия. Увеличение: А – 11.8 кх, Б – 100.0 кх, В – 32.0 кх, Г – 24.0 кх, Д – 100.0 кх, Ж – 12.5 кх, З – 50.0 кх, И – 16.0 кх)

Примечание: А, Б, В - контроль; Г, Д, Е – воздействие кКЖ, стимулирует образование на поверхности *E. faecalis* аморфных хлопьевидных масс (Д, Е)

Внесение кКЖ в питательную среду приводит к появлению на поверхности *E. faecalis* хлопьеобразных аморфных бесформенных масс, в то время как после воздействия

hLO выявлены единичные случаи аномального деления, что проявляется появлением сочленений в местах расхождения (Рисунок 6 – Г, Д, Е).

Установлено, что в глубоких слоях биопленки *E. faecalis* часть популяции бактерий имеют округлую форму, бактерии попарно соединены плотными образованиями, длина которых в ряде случаев превышает длину бактериальной клетки.

При воздействии hLO и кКЖ на *K. pneumoniae* наблюдались множественные дефекты деления клеток, неполное расхождение делящихся клеток, значительное уменьшение размеров бактерий, множественные дефекты клеточных стенок.

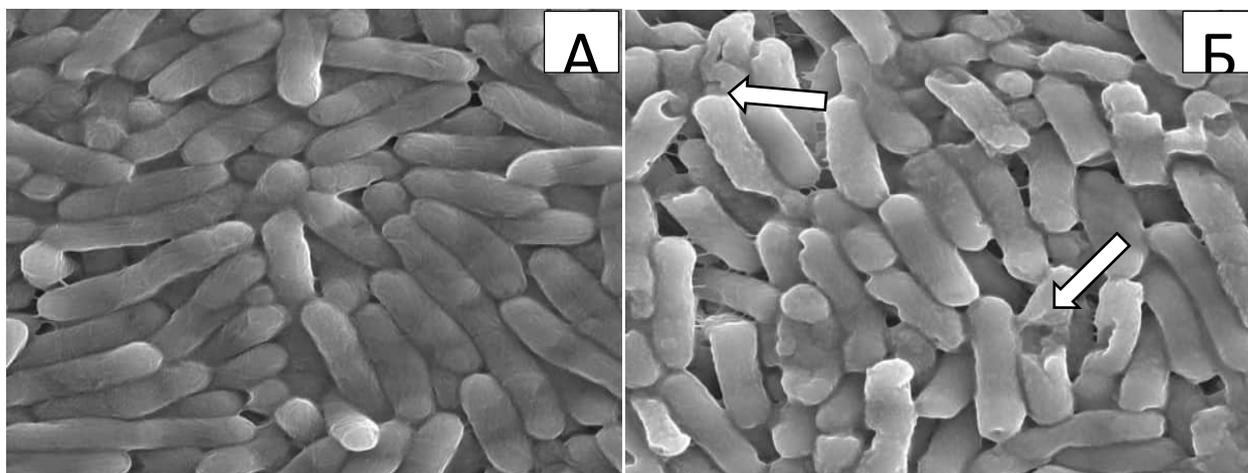


Рисунок 7 – Фрагменты биопленки *P. aeruginosa* (сканирующий электронный микроскоп MIRA «Tescan», Чехия) (Увеличение: А – 50.0 кх, Б – 50.0 кх)

Примечание: А – контроль; Б – воздействие hLO

Кроме этого установлено, что в контрольных образцах *P. aeruginosa* объединены общей капсулой. Под воздействием кКЖ выявлены палочки меньшего размера с “обрубленными” концами, отмечены дефекты различной формы и глубины (Рисунок 7).

К наиболее часто встречающимся аномалиям можно отнести полиморфизм, неполное расхождение клеток при делении, наличие аморфных субстанций на поверхности клеток, предположительно являющихся лизированными фрагментами внеклеточного матрикса биопленки или выпотом клеточного содержимого через цитоплазматическую мембрану. Таким образом при помощи СЭМ были выявлены морфологические изменения в структуре клеточных стенок у *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. aureus* и образованных ими биопленок под действием hLO и кКЖ. К наиболее часто встречающимся аномалиям можно отнести полиморфизм, неполное расхождение клеток при делении, наличие аморфных субстанций на поверхности клеток, предположительно являющихся лизированными фрагментами внеклеточного матрикса биопленки или выпотом клеточного содержимого через цитоплазматическую мембрану.

Исследование иммунологических свойств L-лизин- α -оксидазы на биологических моделях млекопитающих

Для исследования иммунологических свойств в качестве биологических моделей были выбраны морские свинки породы «Агути» возрастом 5 недель массой 230 – 250 г и мыши линий СВА (СВА х С₅₇В1, SHR) возрастом 2 недели массой 18 – 20 г в количестве 20 животных. После получения животные находились в изоляции 2 недели в карантинном блоке вивария Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы (14.02.2021 – 28.02.2021) с ежедневным измерением температуры и массы тела один раз в сутки. Питание (гранулированно-экструдированный корм для мышей ГОСТ 34566 – 2019, гранулированный корм для кроликов и морских свинок ГОСТ 32897 – 2014) и вода были в достатке. Животные содержались с соблюдением всех этических норм. Отмечалось наличие стула и мочеиспускания. Состояние слизистых оболочек склер без изменений.

Для исследования иммунологических свойств LO были выбраны морские свинки и мыши.

Исследование иммунологических свойств LO проводили следующим образом. hLO вводили мышам линии C₅₇Bl внутривенно пятикратно в дозе 35 ЕД/кг. Ежедневно на протяжении четырех недель с начала иммунизации у животных (n = 7) проводили забор крови и полученные сыворотки мышей анализировали методом иммуноферментного анализа. Полученные сыворотки титровали с шагом x2.

Способность LO вызывать анафилаксию была изучена на морских свинках в опытах *in vivo*, согласно стандартному протоколу.

Определение активной системной анафилаксии проводили на морских свинках. Животных иммунизировали внутрисердечно однократно в дозе 35 ЕД/кг (предполагаемая терапевтическая доза). Через 21 день вводили разрешающую дозу – 35 ЕД/кг. В опытной и контрольной группах было по 8 - 10 животных. Интенсивность анафилактической реакции оценивали по четырехбалльной шкале.

Для оценки активной системной анафилаксии использовали анафилактический индекс (АИ). Вычисление анафилактического индекса. $AI = \frac{(ax4) + (bx3) + (cx2) + (gx1) + (dx0)}{a + b + c + g + d}$, где *a* – число животных, с шоком на 4 балла; *b* – число животных с шоком 3 балла; *c* – число животных с шоком 2 балла; *g* – число животных с шоком 1 балл; *d* – число животных без шока.

Для изучения активной кожной анафилаксии использовалась та же биологическая модель, морские свинки. Сенсibilизацию животных на первые сутки производили путем внутрисердечного введения hLO. Доза инъекции рассчитывалась, исходя из веса подопытного животного и составляла 35ЕД/кг. Затем на 21-е сутки производили алергометрическое тестирование. Лабораторным животным внутривенно вводили 0,5%-ный раствор синьки Эванса, согласно стандартному протоколу. После в этот же день морским свинкам внутрикожно вводили hLO в следующих концентрациях: 100,0; 50,0; 10,0 мкг/мл.

Далее оценивали размер кожной реакции в месте внутрикожного введения hLO, если размер зоны реакции был равен или более 5x5 мм, а интенсивность окраски не ниже, чем 2+, кожная проба считалась положительной. Яркость окраски кожи определяли исходя из трех плюсовой шкалы. Для оценки кожной анафилаксии использовали индекс наличия реакции (ИНР) и индекс интенсивности реакции (ИИР). Определения индекса наличия реакции (ИНР). $ИНР = a / b - c / g \cdot 100$, где, *a* – число животных с положительными реакциями в опытной группе; *b* – общее число животных в опытной группе; *c* – число животных с положительными реакциями в контрольной группе; *g* – общее число животных в контрольной группе. В каждой группе было не менее пяти животных.

При попытке разработать лабораторный вариант серологического экспресс метода определения LO в КЖ нам не удалось получить иммунную кроличью сыворотку с антителами к LO, даже при гипериммунизации с использованием полного адьюванта Фрейна. Этот феномен может быть связан с низкой иммуногенностью LO.

В данном эксперименте, полученные от животных сыворотки показали отрицательные результаты серологических, направленных на выявление антител к LO, реакциях: агглютинации, кольцепреципитации и иммуноферментном анализе.

Несмотря на неудачу с получением иммунных сывороток, после гипериммунизации, через 1 месяц животным было проведено исследование на наличие аллергических реакций. Результат также оказался отрицательным, что позволяет предположить, что LO не спровоцирует нежелательные аллергические реакции у млекопитающих.

Изучение иммунологической активности L-лизин-α-оксидазы на мышях в условиях *in vivo* и *in vitro*

Для заключительного вывода о биобезопасности LO требуются дополнительные исследования с использованием других биологических моделей. В ходе дальнейших

экспериментов на морских свинках и мышах было установлено, что динамика гуморального иммунного ответа к введенному hLO не отличается от особенностей антителообразования в ответ на введение белковых антигенов. Максимальное содержание антител наблюдали у животных на 7 – 14-е сутки опыта. В последующие сроки у мышей титр антител снижался до показателей, которые не поддавались определению.

Изучение иммунологической активности L-лизин- α -оксидазы на морских свинках в условиях *in vivo* и *in vitro*

Для изучения иммунологической активности первичную сенсибилизацию животных производили путем введения препарата в терапевтической дозе 35 ЕД/кг, внутрисердечно, однократно. Разрешающую инъекцию проводили через 21 день в той же дозе, внутривенно.

Однократное, внутрисердечное введение hLO в предполагаемой терапевтической дозе 35 ЕД/кг вызывало слабую сенсибилизацию организма животных. Ни в одном случае не были зарегистрированы сильные реакции со смертельным исходом. При изучении иммунологической активности hLO также не было выявлено заметных аллергических реакций несмотря на то, что сенсибилизирующая доза hLO по белку была несколько большей, чем у кКЖ.

Исследования иммунологической активности кКЖ и hLO в перекрестных реакциях, когда сенсибилизировали hLO, а разрешающую дозу вводили кКЖ, не выявили сенсибилизации животных. Значение анафилактического индекса соответствовало $1,0 \pm 0,3$.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что L-лизин- α -оксидаза, кКЖ и hLO, обладает слабой иммунологической активностью при парентеральном введении в дозе 35 ЕД/кг не больше,

Кожносенсибилизирующая активность L-лизин- α -оксидазы

Для определения кожносенсибилизирующей активности hLO и кКЖ морским свинкам вводились внутрикожно hLO и кКЖ в разных концентрациях. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Оценка кожносенсибилизирующей активности hLO и кКЖ по данным кожного тестирования

Форма фермента L-лизин- α -оксидазы	Концентрация раствора тест- аллергена, мкг/мл	Индекс наличия реакции	Индекс интенсивности реакции	p*-значение
кКЖ	100	20	8	<0,05
	50	20	4	<0,05
	10	10	0	<0,05
hLO	100	20	4	<0,05
	50	20	12	<0,05
	10	20	12	<0,05

Примечание: p* – уровень значимости приведен в сравнении с соответствующим контролем

Как видно из данных таблицы 3 кКЖ и hLO, вызывают реакции, оцениваемые по индексу наличия реакции (ИНР) от 0 до 20. Практически между контрольными и тестируемыми животными не было различий по исследованным показателям. Обобщая полученные результаты, можно сделать заключение о слабой кожносенсибилизирующей активности ферментов. Статистически значимых различий между нативным модифицированным ферментом не выявлено. Полученные результаты, по-видимому, можно рассматривать как один из методов оценки сенсибилизации организма, вызванной применением ферментов.

Таким образом, результаты изучения анафилактической активности L-лизин- α -оксидазы в дозе 35 ЕД/кг в опытах *in vivo* и *in vitro* указывают на слабый аллергенный потенциал фермента. Результаты сравнения иммунологической активности L-лизин- α -

оксидазы с некоторыми другими ферментными препаратами, разрешенными Фармкомитетом, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнительная иммунологическая активность LO и других ферментных препаратов

Препарат	Способ введения сенсibiliзирующей дозы	Способ введения	Значение анафилактического индекса
LO	Внутрисердечно однократно	Внутривенно	1,3 ± 0,2
Солизим	Орально многократно	Внутривенно	1,2 ± 0,3
А-амилаза	Орально многократно	Внутривенно	1,2 ± 0,2
Террилитин	Ингаляционно многократно	Внутривенно	1,2 ± 0,3

Как видно из таблицы 4 индекс иммунологической активности LO очень схож с индексами иммунологической активности других ферментных зарегистрированных препаратов, разрешенных к использованию в медицине.

На данном этапе было выявлено, что кКЖ и hLO обладают низкой иммунологической активностью, сопоставимой с зарегистрированными медицинскими препаратами из группы ферментов.

Заключение

В диссертационной работе проведено исследование фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180. Подобраны оптимальные условия культивирования продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 для максимальной продукции им фермента в лабораторных условиях. Получены данные об антагонистическом действии фермента и концентрата культуральной жидкости продуцента по отношению к условно – патогенным и непатогенным микроорганизмам, представителям микробиоты человека. Изучено ингибирующее влияние фермента на процесс биопленкообразования условно – патогенными микроорганизмами, в том числе в отношении уропатогенных *Escherichia coli*, а также дрожжевых грибов рода *Candida*. Определены морфологические изменения биопленок и микроорганизмов в их составе с использованием сканирующей электронной микроскопии. Разработан новый метод определения активности L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости продуцента, уменьшающий временные затраты на опыт, а также исключаящий работу оператора с канцерогенными реактивами. Были проведены исследования цитотоксичности L-лизин- α -оксидазы, в которых фермент показал отсутствие токсического действия на культуру клеток Vero E6. Также фермент L-лизин- α -оксидаза продемонстрировал низкую иммуногенность и аллергенность в опытах на животных моделях.

ВЫВОДЫ

1. При культивировании продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 в лабораторных условиях установлено, что наиболее оптимальные условия продукции фермента L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 следующие: температура +27,0 ± 1,0 0C; - pH – 6,7- 7,1; в атмосфере воздуха, при смешанной культивации, с постоянным перемешиванием среды 80–120 rpm/min; продолжительность культивирования - от 5 до 12 дней, максимальная активность фермента определяется на 11 – 12 сутки.

2. Для оценки активности фермента L-лизин- α -оксидазы усовершенствован экспресс метод, который основан на использовании тетраметилбензидаина, показавший более высокую чувствительность и биологическую безопасность.
3. Наибольшую активность фермент L-лизин- α -оксидаза проявляет в отношении грамположительных бактерий, представителей родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* (17 – 24 мм – для гомогенного фермента, от 9 мм до 16 мм для концентрата культуральной жидкости), в сравнении с грамотрицательными бактериями представителями семейства *Enterobacteriaceae* (11 – 16 мм – для гомогенного фермента, 6 – 10 мм для концентрата культуральной жидкости) и неактивен в отношении дрожжевых грибов рода *Candida*.
4. Противомикробным действием в отношении полирезистентных уропатогенных *E. coli* обладает и культуральная жидкость, и гомогенный фермент L-лизин- α -оксидаза.
5. Ингибирование образования биопленок микроорганизмами зависит от концентрации фермента L-лизин- α -оксидазы, которая составила 1 мг/мл как для грамположительных микроорганизмов, так и для грамотрицательных, в том числе и для полирезистентных уропатогенных *E. coli*.
6. Фермент L-лизин- α -оксидаза не обладает иммунологической активностью.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовать к использованию L-лизин- α -оксидазу для разработки препаратов и/или комбинированных веществ с целью профилактики развития эндогенных осложнений, ассоциированных с условно – патогенными микроорганизмами и/или нозокомиальными инфекционными агентами, в том числе, способными к биопленкообразованию.
2. Раннее применение L-лизин- α -оксидазы может помочь предотвратить формирование биоплёнок бактериями.
3. Необходимо определить оптимальные концентрации L-лизин- α -оксидазы для максимальной эффективности против полирезистентных грамотрицательных бактерий.
4. Стоит рассмотреть возможность комбинирования L-лизин- α -оксидазы с традиционными антибиотиками для повышения их эффективности.
5. Перед широким применением фермента в медицинской практике необходимо провести клинические исследования для подтверждения его безопасности и эффективности.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для полного раскрытия потенциала L-лизин- α -оксидазы и его успешного внедрения в практическую медицину необходимы дальнейшие исследования в таких направлениях, как:

- разработка более эффективных и экономичных методов культивации *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 для увеличения выхода и стабильного производства L-лизин- α -оксидазы.
- исследование способов модификации L-лизин- α -оксидазы для повышения его иммуногенности с целью разработки надежных серологических методов определения концентрации фермента в биологических системах;
- поиск альтернативных подходов к иммунизации животных или использование рекомбинантных технологий для получения устойчивых антител к L-лизин- α -оксидазе;
- проведение более широких доклинических испытаний для оценки безопасности L-лизин- α -оксидазы при различных способах введения и длительности применения;
- тестирование L-лизин- α -оксидазы в различных моделях инфекционных и онкологических заболеваний для подтверждения его терапевтической эффективности и определения оптимальных дозировок;
- детальное исследование молекулярных механизмов, посредством которых L-лизин- α -оксидаза препятствует образованию биопленок, что может привести к разработке новых метаболитов или комбинаций препаратов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Senyagin, A. N.** Determination of the activity of antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase / **A. N. Senyagin, I. V. Podoprigora, I. P. Smirnova** // FEBS Open Bio, 6-11 июля 2019 г., г. Краков. — Краков, 2019. — Vol. 9, iss. S1. — P. 369.
2. **Сенягин, А. Н.** Изучение активности и антагонистического действия фермента L-lysine- α -oxidase, содержащегося в культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 / **А. Н. Сенягин, И. П. Смирнова, И. В. Подопригора, Л. А. Смолякова** // Сборник докладов Пятой Междисциплинарной конференции «Молекулярные Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» под редакцией К. В. Кудрявцева и Е. М. Паниной, 15 – 18 сентября 2019 г., г. Судак. – Судак, 2019. – Т. 22, №3. – С. 222.
3. **Senyagin, A. N.** A Novel Express Method to Determine Activity of Antitumor Enzyme L-Lysine- α -Oxidase of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 / **A. N. Senyagin, A. F. Larichev, I. P. Smirnova, I. V. Podoprigora** // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** — 2020. — Vol. 169, № 1. — P. 119-121.
4. **Smirnova, I. P.** Characterization of L-Lysine-A-Oxidase, A New Antitumor and Antiviral Drug Substance Synthesized by *Trichoderma* / **I. P. Smirnova, V. I. Kuznetsov, I. V. Podoprigora, T. I. Mansur, A. N. Senyagin, I. G. Bashkirova** // **International Journal of Life Science and Pharma Research.** — 2022.- Vol.12, № SP23. — P. 15-20.
5. **Арсенюк, А. Ю.** Исследование активности фермента L-лизин- α -оксидазы, выделенного из культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai / **А. Ю. Арсенюк, А. Н. Сенягин** // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспертизы сырья и продуктов животного происхождения, 8 ноября 2022 г., г. Москва. – Москва, 2022. – С. 199–200.
6. **Senyagin, A.** The Effects of L-Lysine- α -oxidase Enzyme and *Trichoderma harzianum* Rifai Culture Liquid on the Formation of Biofilms by Uropathogenic Multiresistant *E. coli* / **A. Senyagin, N. Sachivkina, M. Das, V. Semenova, O. Kuznetsova, A. Ibragimova** // **Fermentation.** — 2023. — Vol. 9, № 8. — P. 710.
7. **Меликишвили, Е. М.** Влияние фермента L-лизин- α -оксидазы на образование биопленок у полирезистентных уропатогенных *Escherichia coli* / **Е. М. Меликишвили, А. Н. Сенягин, И. В. Подопригора** // XVIII Международная (XXVII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых: Материалы международной конференции, 16 марта 2023 г., г. Москва. – Москва, 2023. — С. 133–134.
8. **Калинечева, М. А.** Влияние культуральной жидкости гриба *Trichoderma harzianum* Rifai на ингибирование цитотоксической активности условно-патогенных микроорганизмов / **М. А. Калинечева, А. Н. Сенягин, М. С. Дас, И. В. Подопригора** // Проблемы медицинской микологии (Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVI Кашкинские чтения)), 7 - 9 июня 2023 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2023. - Т. 25, №2. – С. 117.
9. **Senyagin, A.** The Influence of L-Lysine-Alpha-Oxidase on the Biofilm Formation of Opportunistic Microorganisms Associated with Inflammatory Diseases of the Urinary Tract / **A. Senyagin, N. Sachivkina, M. Das, A. Arsenyuk, R. Mannapova, A. Mannapov, T. Kubatbelov, D. Svistunov, O. Petrkhina, A. Zharov, N. Zhabo** // **Pathogens.** — 2024. — Vol. 13, № 3. — P. 252.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1. А - активность
2. ИЛМР – индекс лекарственной мультирезистентности
3. КЖ – культуральная жидкость
4. кКЖ – концентрат культуральной жидкости
5. LO – L-лизин- α -оксидаза
6. hLO – гомогенный фермент L-лизин- α -оксидаза

7. МИК – минимальная ингибирующая концентрация
8. СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
9. УПКП – уропатогенные кишечные палочки
10. CRA – Конго-красный агар
11. МtP – метод микропланшетного культивирования
12. Rho (ρ) – коэффициент ранговой корреляции Пирсона