

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ
ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ»**

На правах рукописи

СЕНЯГИН АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ

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

диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

1.5.11 Микробиология

Научный руководитель –
кандидат медицинских наук,
доцент Подопригора И. В.

Москва – 2024

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности темы исследования.....	9
Цель исследования	10
Задачи исследования:.....	10
Научная новизна.....	11
Теоретическая и практическая значимость	12
Методология и методы исследования.....	13
Материалы исследования	14
Объект исследования	14
Штаммы микроорганизмов	14
Клеточные линии.....	15
Биологические модели млекопитающих	15
Культивирование продуцента <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai F – 180	15
Выделение исследуемого L-лизин- α -оксидазы методом ультрафильтрации .	17
Видовая идентификация микроорганизмов	20
Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам	21
Определение минимальной ингибирующей концентрации L-лизин- α - оксидазы у исследуемых микроорганизмов методом серийных разведений .	23
Определение антагонистического действия фермента L-лизин- α -оксидазы и концентрата культуральной жидкости по отношению к избранным микроорганизмам	24
Определение биопленкообразования микроорганизмами и подавления биопленкообразования L-лизин- α -оксидазой и концентратом культуральной жидкости методом микропланшетного культивирования.....	25

Исследование влияния L-лизин- α -оксидазы на биопленкообразование при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).....	26
Определение и оценка цитотоксического действия L-лизин- α -оксидазы на культуру клеток Vero E6	27
Статистическая обработка результатов	28
Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации	28
Основные положения, выносимые на защиту.....	29
Степень достоверности и апробация результатов	29
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	31
1.1. АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В МИРЕ, КАК ПРОБЛЕМА СОВРЕМЕННОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ	31
1. 2. МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ.....	37
1. 3. БИОПЛЕНКИ КАК ФАКТОР АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ	41
1. 4. ПРИЧИНЫ И МЕХАНИЗМЫ РАСПРОСТРАНЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ	44
1. 5. ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ – АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПОДХОД К АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ	47
1. 6. ГРИБЫ РОДА <i>TRICHODERMA</i> КАК ПРОДУЦЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	50
1. 7. L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗА – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТ ГРИБОВ РОДА <i>TRICHODERMA</i>	59
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	67
ГЛАВА 2. ДИЗАЙН ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	67

ГЛАВА 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТА <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> RIFAI F – 180 И ВЫДЕЛЕНИЕ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ.....	70
ГЛАВА 4. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ РЕАКЦИИ	75
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ	83
5. 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОГРАММЫ	83
5. 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ.....	93
5. 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ И КОНЦЕНТРАТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> RIFAI F - 180 ПО ОТНОШЕНИЮ К УПКП .	98
5. 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> НА КОНГО – КРАСНОМ АГАРЕ (CRA).....	102
5. 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ МИКРОПЛАНШЕТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	105
5. 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ МЕТОДОМ МИКРОПЛАНШЕТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	107
5. 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ ПРИ ПОМОЩИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ (СЭМ)	113
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЭУКАРИОТИЧЕСКИМ КЛЕТКАМ.....	121

ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	122
7.1. РАЗРАБОТКА СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ЭКСПРЕСС МЕТОДА КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	122
7. 2. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ L–ЛИЗИН– α –ОКСИДАЗЫ НА МЫШАХ В УСЛОВИЯХ <i>IN VIVO</i> И В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	126
7. 3. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ L–ЛИЗИН– α –ОКСИДАЗЫ НА МОРСКИХ СВИНКАХ В УСЛОВИЯХ <i>IN VIVO</i> И В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	127
7. 4. КОЖНОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ L–ЛИЗИН– α –ОКСИДАЗЫ.....	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
ВЫВОДЫ.....	138
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	139
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	140
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	141
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Антибиотикорезистентность представляет собой одну из наиболее значимых проблем современной медицины [7, 125, 136]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 2019 год зарегистрировано более 4,95 миллиона смертей, обусловленных инфекциями, вызванными резистентными микроорганизмами [191]. 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 [104], растительных экстрактов [14, 15] и наночастиц [78, 79].

Антимикробные пептиды представляют собой низкомолекулярные белковые молекулы, обладающие выраженной антагонистической активностью по отношению к широкому спектру микроорганизмов, включая бактерии, грибы и вирусы [109]. Источниками антимикробных пептидов могут быть как сами микроорганизмы, особенно представители рода *Bacillus*, так и растения, и животные [104]. Одним из механизмов бактериостатического действия этих субстанций является нарушение синтеза компонентов клеточной стенки бактерий [104].

Экстракты растений представляют собой перспективный и эффективный подход борьбы с «супербактериями». Фитохимические соединения, обладающие антимикробной активностью, включают алкалоиды, флавоноиды, хиноны и кумерины [14, 15]. Доказано, что компоненты растительных экстрактов ингибируют способность микроорганизмов формировать биопленки [22, 89].

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 [78]. Однако некоторые исследователи отмечают, что наночастицы могут накапливаться в лимфатических узлах, печени, почках и селезенке, вызывая цитотоксический эффект у лабораторных животных [79, 112].

Несмотря на значительный потенциал вышеупомянутых направлений, поиск антибактериальных субстанций микробного происхождения сохраняет свою актуальность [70]. 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 [3 – 5]. 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^2 -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 [105].

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 [17, 85, 86]

Впервые род *Trichoderma* был описан немецким микологом С. Н. Persoon [138], 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 [173] 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 [6].

Значительный вклад в понимание свойств рода *Trichoderma* был сделан Робертом Вайнлингом в 1932 году [187], 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 M. A. Rifai [143], который предложил концепцию "агрегатов видов" и определил девять видов на основе морфологических характеристик. В 1991 году J. Bissett [27 – 29] 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 [56] 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 [122] 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 [98]. Советские ученые смогли изолировать свой штамм продуцента - *Trichoderma harzianum* Rifai - F-180 [9].

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 [14]. В 2015 году была продемонстрирована противоопухолевая активность L-лизин- α -оксидазы по отношению к ксенотрансплантатам опухолей толстого кишечника человека, включающих линии HCT 116, LS174T, T47D [14].

Е. В. Лукашевой был продемонстрирован теоретический ноотропный эффект, оказываемый L-лизин- α -оксидазой, за счет снижения уровней L-лизина и полиаминов в головном мозге [104]. 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* [170]. 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 [169]. Неоднократно исследователями было

описано ингибирующее действие L – лизин – α – оксидазы в отношении фитопатогенов, например, в отношении тосповируса [17, 85, 86].

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

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 биоплёнок 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 биоплёнки.

Низкий уровень алергогенности 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 и методы 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: бактериологические, микроскопические, биотехнологические, биохимические, молекулярно-

генетические, иммунологические, культуромные, биологические методы исследования.

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

Материалы исследования

Объект исследования

Объект настоящего исследования – культура продуцента - *Trichoderma harzianum* Rifai F - 180 и лиофильновысушенный очищенный фермент L-лизин- α -оксидазы, предоставленные 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.

Штаммы микроорганизмов

В работе были использованы типовые штаммы *Staphylococcus aureus* ATTC 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*

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.

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.

Биологические модели млекопитающих

1. Кролики породы «советская шиншилла», возраст 80 – 85 дней, масса 2,5 – 3 кг. Получены из биопитомника «Стезар», Владимирская обл., Суздальский район, поселок Красногвардейский.

2. Морские свинки породы «Агути», возраст 5 недель, масса 230 – 250 г, полученные от вивария ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

3. Мыши линии СВА (СВА х С₅₇В1, SHR), возраст 2 недели, масса 18 – 20 г, полученные от вивария ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Культивирование продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180

Перед ферментацией, культуру гриба *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 высевали на 90 мм чашки Петри (Перинт, Россия) с сусло – агаром (HiMedia M129, Индия; 15 мл среды / чашка) методом укола и помещали в термостат (Incubator Being, КНР), время инкубации 14 дней при температуре

27±1°C. По окончании подращивания, культуру продуцента осматривали визуально, микроскопировали воздушный мицелий (оптический микроскоп Микромед 1 вар. 2-20, Микромед, Россия; окуляр х объектив: 10х40 и 10х100, увеличение х400 и х1000).

После подращивания культуры продуцента с чашки отбирали пробу для контроля отсутствия контаминации при микроскопии (оптический микроскоп Микромед 1 вар. 2-20, Микромед, Россия; окуляр х объектив: 10х40 и 10х100, увеличение х400 и х1000) и посева на мясо - пептонный агар (HiMedia M012, Индия), агар Сабуро (HiMedia M033, Индия) и мясо – пептонный бульон (HiMedia M244, Индия). Микроскопически (оптический микроскоп Микромед 1 вар. 2-20, Микромед, Россия; окуляр х объектив: 10х40 и 10х100, увеличение х400 и х1000) определяли наличие конидиоспор без окрашивания и с применением простого метода окрашивания, в качестве красителя использовали 0,1% водный раствор метиленового синего (ЧДА 98%, ЛенРеактив, Россия).

Для процесса ферментации и наработки исследуемого фермента, культуру продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F - 180 вносили в колбы для первичного культивирования со средой Сода, приготовленной в лабораторных условиях согласно протоколу автора [100], составом: дистиллированная вода – 1000 мл; пшеничные отруби мелкого помола – 100 г; азотнокислый натрий (NaNO₃) – 8,0 г. Все компоненты среды помещали в термостойкую колбу и автоклавировали (ГК-100-3, ТЗМОИ, Россия; режим 1.1 атм. 124±1°C в течение 60 минут), с соблюдением правил асептики вносили инокулят продуцента, площадью 1 см², вырезанный из среды с рабочей культурой. Колбу помещали в шейкер-инкубатор (Heidolph Unimax 1010, Германия) и инкубировали (режим 180 – 200 об / мин при 28±1°C) в течение 4 – 5 суток. После выращивания посевной культуры из каждой колбы отбирали пробу и проводили контроль отсутствия контаминации при микроскопии и посева на мясо - пептонный агар (HiMedia M012, Индия), агар Сабуро (HiMedia M033, Индия) и мясо – пептонный бульон (HiMedia M244, Индия).

Посевная культура отвечала следующим требованиям: при микроскопии (оптический микроскоп Микромед 1 вар. 2-20, Микромед, Россия; окуляр х объектив: 10x40 и 10x100, увеличение x400 и x1000) определялся хорошо развитый мицелий, без спорообразования (продуцент на стадии вегетативного роста), контаминация отсутствовала.

Инокулят вносили путем изъятия продуцента и среды культивирования объемом 15 мл, с последующим внесением в среду Сода, приготовленной в лабораторных условиях согласно протоколу автора [100]. Ферментацию проводили в смешанном варианте (глубинная и поверхностная ферментация) в течение 12 дней на шейкер – инкубаторе (Heidolph Unimax 1010, Германия) при температуре $27\pm 1^\circ\text{C}$ и 80 rpm, для постоянной аэрации среды и перемешивания субстрата.

Каждые 2 дня проводился забор 2 мл среды в целях определения активности фермента, концентрации общего белка в среде и постановки электрофореза для визуального контроля синтеза фермента.

По истечению 12 дней ферментации, на пике продукции L-лизин- α -оксидазы, проводилась первичная грубая очистка путем фильтрации через стерильные марлевые салфетки в целях удаления грубых частиц, конгломератов среды и мицелия в культуральной жидкости. Затем проводилась фильтрация через стерилизующую мембрану (размер пор 0,22 мкм; Millipore GS, Франция) с установкой дополнительного префильтра (Millipore, Франция). Режим фильтрации: P – 7 - 10 psi, температура 25 – 30°C.

Выделение исследуемого L-лизин- α -оксидазы методом ультрафильтрации

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 [199].

Первая фильтрация проводилась через мембрану XM300 (> 300,000 MW; Millipore XM300 quantily – 25, Франция) для отсечения крупно - молекулярных белков, массой выше 300 кДа. Режим фильтрации: P – возрастание от 7 psi до 20 psi (0,5 – 1,5 атм.), температура 25 – 30°C. Ретентат очищался путем диализа - пятикратной промывки фосфатным буфером (рН 7,1) с последующим контролем очистки по оптической плотности с использованием спектрофотометра (СФ – 2000, Россия) в диапазоне длин волн от 200 до 1000 нм, с шагом 0,1 нм. Ретентат удалялся, а пермиат переходил на второй этап очистки.

Второй этап очистки проводился на мембране XM150 (150 000 MW; Millipore XM150 quantily – 25, Франция). Отмывку мембраны от защитного слоя глицерина проводили путем выдерживания в дистиллированной воде в течение 60 минут. Режим фильтрации: P – возрастание от 7 psi - до 25 psi (0,5 – 2,0 атм), температура 25 – 30°C Ретентат очищался путем диализа - пятикратной промывки фосфатным буфером (рН 7,1) с последующим контролем очистки по оптической плотности с использованием спектрофотометра (СФ – 2000, Россия) в диапазоне длин волн от 200 до 1000 нм, с шагом 0,1 нм. Ретентат удалялся, а пермиат переходил на третий этап очистки.

Третий этап очистки проводился на мембране UM20E (>15-25,000 MW; Millipore UM20E quantily – 25, Франция). Отмывку мембраны от защитного слоя глицерина проводили путем выдерживания в дистиллированной воде в течение 60 минут, согласно рекомендации производителя. Режим фильтрации: P – возрастание от 15 psi - до 75 psi (1,0 – 5,0 атм.), температура 25 – 30°C Ретентат очищался путем диализа - пятикратной промывки фосфатным буфером (рН 7,1) с последующим контролем очистки по оптической плотности с использованием спектрофотометра (СФ – 2000, Россия) в диапазоне длин волн от 200 до 1000 нм, с шагом 0,1 нм. Показателем чистоты являлось полное отсутствие белка в пермиате после промывки. Ретентат уходил в дальнейший опыт, а пермиат удалялся из эксперимента.

Контроль присутствия фермента L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости продуцента и выделенной фракции, полученной в ходе многоступенчатой ультрафильтрации, производили при помощи электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием денатурирующего раствора для обработки аликвоты, следующего состава: 2,4 г SDS (Amresco, США); 7,5 мл 1М Трис (pH=6,8; Amresco, США); 0,24 мл 0,5М ЭДТА (Amresco, США); 15,1 г глицерина (12мл); 3,0 мл β -меркаптоэтанола (Amresco, США); 1,2 мг бромфеноловый синий (ЧДА, ЛенРеактив, Россия). Для разделения белков был использован 12,5% агарозный гель составом: 12,5 мл 30% акриламида (Toronto Research Chemicals, Канада); 9,7 мл H₂O; 7,50 мл 1,5М Трис-буфера (pH=8,8; Amresco, США); 0,30 мл 10% SDS. В качестве контроля молекулярных масс использовали маркер с диапазоном масс - 118,0–19,0 кДа: 118 кДа; 90.0 кДа; 50.0 кДа; 34.0 кДа; 26.0кДа; 19.0 кДа (Fermentas PureExtreme, Литва). В качестве положительного контроля использовали лиофильно высушенную очищенную L-лизин- α -оксидазу. Прибор для проведения электрофореза – PowerPac Basic (Bio-Rad, США), с выставленным напряжением тока: 9мА на контур. Определение общего белка в культуральной жидкости и при диализе производилось с использованием стандартных методов - спектрофотометрическим методом [166], методом Брэдфорда [34] и методом Лоури [112].

Активность фермента в концентрате культуральной жидкости определяли с использованием специально разработанного метода, описанного далее. Под активностью фермента понимается количество фермента, способного катализировать образование 1 мкмольа перекиси водорода (H₂O₂) за одну минуту при температуре 37°C. Для расчета активности фермента применялась следующая формула: $A = \frac{D \cdot P \cdot V}{v \cdot t}$, где: A – активности фермента выраженная в единицах (E) на 1 мл (E/мл) или 1 мг (E/мг); D – оптическая плотность пробы; P – разведение ферментного раствора; V – объем полной реакционной смеси; v – объем вносимого раствора, содержащего фермент; t –

время инкубации, в течение которого происходит реакция. Удельная активность фермента рассчитывается как количество единиц активности на 1 мг белка (в случае очищенного лиофилизированного фермента) или на 1 мл водного экстракта культуры (культуральной жидкости). Это позволяет более точно оценить эффективность фермента относительно его концентрации в образце. В результате проведенных исследований была определена активность L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости, которая находилась в диапазоне значений от 0,54 до 0,58 Е/мл. Это значение свидетельствует о наличии активного фермента в исследуемом образце. Кроме того, активность L-лизин- α -оксидазы в концентрате культуральной жидкости была измерена в диапазоне от 2,84 до 2,88 Е/мл, что указывает на значительно более высокую концентрацию фермента в этом образце по сравнению с исходной культуральной жидкостью. Для L-лизин- α -оксидазы, выделенного при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (NGC Chromatography system, BioRad, США) из культуральной жидкости, активность определялась в значениях равных 50,3 - 51,1 Е/мг.

Видовая идентификация микроорганизмов

Идентификацию микроорганизмов проводили при помощи секвенирования по Сэнгеру амплифицированного фрагмента области гена 16S рРНК.

Для выделения нуклеиновых кислот в данном исследовании использовался коммерческий набор HiPure Universal DNA Kit (Magen, КНР). После выделения ДНК производилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации определенного участка гена 16S рРНК. Этот ген является ключевым для идентификации бактерий, так как его последовательности сохраняются во всех прокариотах, но в то же время имеют достаточно вариаций для различия видов. Для амплификации использовались универсальные бактериальные праймеры 27F и 1492R, которые обеспечивали специфичность реакции. Процесс ПЦР включал 35 циклов, в ходе которых происходили три основных этапа: денатурация, отжиг праймеров и элонгация.

Этап денатурации происходил при температуре 94 °С в течение 20 секунд. Отжиг праймеров происходил при температуре 58 °С в течение 20 секунд. Этап элонгации производился при температуре 72 °С в течение 20 секунд 90 секунд. Синтез универсальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') был выполнен компанией «Евроген» в Москве. После завершения ПЦР полученный продукт очищался с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия), что позволило удалить ненужные компоненты и улучшить качество дальнейшего анализа. Секвенирование амплифицированного фрагмента ДНК проводилось по методу Сэнгера. Секвенирование осуществлялось в компании «Евроген» (Россия). Качество секвенирования оценивалось с помощью программы Chromas Lite, версия 2.6.6 (Technelysium Pty. Ltd.; Австралия), которая позволяет визуально анализировать электрофореграммы и определять границы отсечения последовательностей, обеспечивая точность дальнейшего анализа. Для определения видовой принадлежности бактерий использовался поиск нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank (NCBI, США, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Алгоритм Megablast (NCBI, США) позволяет эффективно сравнивать полученные последовательности с уже известными, что является важным шагом для идентификации видов. Сравнение считалось успешным на уровне вида, если частично секвенированная последовательность гена 16S рРНК имела $\geq 98,7\%$ сходства с последовательностью ближайшего известного вида.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Оценку чувствительности к антибактериальным препаратам избранных микроорганизмов с помощью диско – диффузионного метода [20, 80, 178] проводили, согласно критериям Европейского комитета по определению

чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, версия 14.0) [123].

Бульонную культуру тестируемых штаммов получали при культивировании 100 мкл криообразцов бактерий в 10 мл среды: сердечно-мозговой бульон (HiMedia M210, Индия) или сердечно-мозговой бульон с внесением 1% глюкозы для факультативных анаэробов; MRS – бульон для лактобактерий (HiMedia M369, Индия). 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).

После культивирования, бульонную культуру центрифугировали в течение 10 минут при скорости вращения ротора 2400 rpm (центрифуга ELMi SkyLine CM-6M, Латвия). Бактериальную суспензию для посева готовили из микробного осадка по стандарту мутности 0,5 по McFarland (HiMedia, Индия), в физиологическом растворе (0,9% NaCl, Helicon, Россия).

Полученную бактериальную суспензию объемом 100 мкл засеивали методом «газона» на агар Мюллера – Хинтона (HiMedia M211, Индия) – 20 мл среды, чашка 90 мм (Перинт, Россия). После посева на поверхность агара выкладывались тест – диски с антибиотиками. В качестве отрицательного контроля использовали стерильный физиологический раствор хлорида натрия (0,9% NaCl, Helicon, Россия).

В исследовании использовали следующие коммерческие – тест - диски с антибиотиками: Имипенем 10 мкг / диск (Imipenem, IPM10 – SD073), Цефтазидим 30 мкг / диск (Ceftazidime, CAZ30 – SD062), Цефтриаксон 30 мкг / диск (Ceftriaxone, CTR30 – SD065), Цефтазидим с клавулановой кислотой 30 / 10 мкг / диск (Ceftazidime / Clavulanic acid, CAC30/10 – SD207), Амоксиклав 30 мкг / диск (Amoxyclav, AMC30 – SD063), Нитрофурантоин 200 мкг / диск (Nitrofurantoin, NIT200 – SD090), Ампициллин 25 мкг / диск (Ampicillin, AMP25 – SD077), Триметоприм 30 мкг / диск (Trimethoprim, TR30

– SD149), Ципрофлоксацин 30 мкг / диск (Ciprofloxacin, CIP30 – SD142), Тетрациклин 30 мкг / диск (Tetracycline, TE30 – SD037), Цефтриаксон 30 мкг / диск (Ceftriaxone, CTR30 – SD065) – HiMedia, Индия. Эксперимент проводили в пятикратной повторности для каждой из указанных культур.

Определение минимальной ингибирующей концентрации L-лизин- α -оксидазы у исследуемых микроорганизмов методом серийных разведений

Антагонистическую активность L-лизин- α -оксидазы по отношению к исследуемым микроорганизмам определяли методом серийных разведений, на грамположительных и грамотрицательных бактериях, в том числе на изолятах УПКП в количестве 70 штаммов, взятых из рабочей коллекции штаммов кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института ФГАОУ ВО РУДН имени Патриса Лумумбы.

С целью минимизации ошибки, связанной с работой с микрообъемами, было применено масштабирование эксперимента, в связи с этим исследование производилось в пробирках с объемом среды 10 мл, а не в микропланшетах [46].

Для определения МИК – минимальной ингибирующей концентрации, бактериальную тест – культуру, после размораживания, объемом 100 мкл / 1 депонатор вносили в 10 мл сердечно-мозгового бульона (HiMedia M210, Индия), среды MRS-бульона (HiMedia M369, Индия) для лактобактерий, сердечно – мозговго бульона (HiMedia M210, Индия) с добавлением глюкозы до 1% для стрептококков, Сабуро бульона с глюкозой (HiMedia M033, Индия) для дрожжевых грибов рода *Candida*. В среду вносили L-лизин- α -оксидазу, доводя конечную концентрацию до следующих значений: 0,1 г/мл; 0,75 г/мл; 0,5 г/мл; 0,25 г/мл; 0,01 г/мл; 0,001 г/мл; 0,0001 г/мл. Культивирование проводилось в течение 24 часов при температуре 37°C (Incubator Being, КНР). После инкубации визуально оценивали наличие или отсутствие роста культуры по мутности среды в сравнение с контрольными пробирками без действующего вещества.

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

Этапы подготовки и культивирования микроорганизмов были следующие: после размораживания криопробирок при комнатной температуре, культуры объемом 100 мкл / 1 депонатор вносили в 10 мл сердечно-мозгового бульона (HiMedia M210, Индия), среды MRS-бульона (HiMedia® M369, Индия) для лактобактерий, сердечно – мозговго бульона (HiMedia M210, Индия) с добавлением глюкозы до 1% для стрептококков, Сабуро бульона (HiMedia M033, Индия) для дрожжевых грибов рода *Candida*.

Культивирование проводилось в течение 24 часов при температуре 37°C (термостат Being, КНР). После инкубации готовили бактериальную суспензию по стандарту мутности 0,5 McFarland (HiMedia, Индия) – $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ / мл, в физиологическом растворе (0,9% NaCl). С этой целью бульонную культуру центрифугировали в течение 10 минут - 2400 rpm (центрифуга ELMi SkyLine CM-6M, Латвия). Бактериальную суспензию для посева готовили из микробного осадка. Полученную бактериальную суспензию объемом 100 мкл засеивали методом «газона» на Мюллера – Хинтона агар (HiMedia M173, Индия) – 15 мл среды, диаметр чашки Петри - 90 мм (Перинт, Россия).

После посева, на агар выкладывали подготовленные диски и наносили концентрат культуральной жидкости или раствор L-лизин- α -оксидазы в концентрациях: 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).

Оценку антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы и концентрата культуральной жидкости по отношению к избранным микроорганизмам лунко – диффузионным методом проводили [21, 81, 178], ориентируясь на критерии Европейского комитета по определению

чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, версия 14.0) [123].

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

Штаммы исследуемых микроорганизмов культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C на среде Мюллера – Хинтона бульон (HiMedia M391, Индия) с дополнительным внесением глюкозы до 1%, объем среды – 5 мл.

После инкубации, культуры центрифугировали при режиме $2,4 * 10^3$ rpm для осаждения бактерий. Отбирали супернатанты и вносили 1 мл 0,9% хлорида натрия. Ресуспензировали осадок микроорганизмов на вортексе. Подготавливали бактериальную суспензию в соответствии со стандартом мутности 0,5 McFarland (HiMedia, Индия).

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, 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 [46, 179].

После инкубации лунки планшета трижды промывали фосфатным буфером (Amresco, США). Сушили в течение 15 минут на воздухе при комнатной температуре. Далее вносили 1% раствор кристаллического – фиолетового (ЧДА, ЛенРеактив, Россия) в каждую лунку. Инкубировали 15 минут на воздухе при комнатной температуре и еще раз промывали раствором фосфатного буфера (Amresco, США). Сушили 15 минут на воздухе при комнатной температуре. После чего в каждую лунку вносили по 15 мкл 96%

этанол. Инкубировали 15 минут на воздухе при комнатной температуре и фиксировали результат 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 глюкозой (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.

Для проведения электронно-микроскопического исследования биологические объекты - мембранные фильтры с культурой микроорганизмов фиксировали парами 25% - глутарового альдегида (AppliChem, Германия) в течение 24 часов. Контрольные образцы стабилизировали до постановки эксперимента. Кусочки мембранных фильтров с интересующими участками двукратно обезвоживались парами пропилен оксида (Sigma-Aldrich, США). Для отведения избыточного заряда с поверхности образца - препараты напыляли ионами золота с целью создания токопроводящего слоя. Исследование морфологии биоплёнок микроорганизмов проведено на сканирующем электронном микроскопе Mira (Tescan, Чехия) с использованием детекторов отраженных (BSE) и вторичных электронов (SE). Ускоряющее напряжение 5-8 кВ, ток пучка составлял 2,5-7 нА [2].

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 объёме 200 мкл и в соответствии со схемой опыта [121].

Каждая концентрация L-лизин- α -оксидазы тестировалась в 4 параллельных стрипах (рядах) согласно схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1 – Схема эксперимента по изучению цитотоксического действия L-лизин- α -оксидазы на культуре клеток Vero E6

	№ лунки/ концентрация препаратов, мкг/мл				Контроль клеток			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	640				КК			
B	320				КК			
C	160				КК			
D	80				КК			
E	40				КК			
F	20				КК			
G	10				КК			
H	5				КК			

Примечание: КК – контроль клеточной линии

Планшет с культурой клеток инкубировали в течение 96 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ (Being CO₂ Incubator, КНР). После инкубирования клеток с L-лизин- α -оксидазой визуально оценивали состояние клеточного монослоя. Жизнеспособность клеток оценивали при оптической и фазово-контрастной микроскопии (микроскоп, инвертированный БИОЛАБ – И, Биолоб, Россия; окуляр x объектив: 10x40, увеличение x400) с окрашиванием 0,4% водным раствором трипанового синего (Servicebio Technology, Ltd., Бельгия).

Статистическая обработка результатов

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 соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Диссертантом 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 арбовирусов 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.

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 орто-дианизидингидрохлорида 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 и апробация 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

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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В МИРЕ, КАК ПРОБЛЕМА СОВРЕМЕННОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Открытие антибиотиков в начале XX века стало революционным событием в медицине, значительно изменив подходы к лечению инфекционных заболеваний. Антимикробные препараты приобрели ключевую роль в терапевтической практике, обеспечивая эффективное лечение не только инфекционных заболеваний у человека и животных, но и выполняя функции антисептических средств в различных медицинских вмешательствах, включая обширные хирургические операции, стоматологические процедуры, катетеризацию и другие инвазивные манипуляции [19, 136, 191].

С середины XX века начались постоянные наблюдения за развитием устойчивости бактерий к антимикробным препаратам, что вызвало беспокойство медицинского сообщества [23, 184]. В последующие десятилетия проблема антибиотикорезистентности стала предметом интенсивных научных исследований, о чем свидетельствует рост публикаций в данной области [70, 125, 134]. Согласно международной базе данных PubMed, количество научных работ и исследований, посвященных антибиотикорезистентности, неуклонно увеличивается. В 2019 году было опубликовано около 7000 статей, в 2020 году – более 8000, в 2021 году – 8600, а в 2024 году их число превзошло 15000.

Глобальный масштаб проблемы подтверждается данными международного проекта «Resistomap», направленного на мониторинг и анализ уровня антибиотикорезистентности в различных странах. Проект «Resistomap» представляет собой платформу для систематического сбора и обновления информации о распространенности устойчивых микроорганизмов, основываясь на научных публикациях. Эти данные позволяют оценивать динамику и географию антибиотикорезистентности,

более 4,95 миллиона смертей, обусловленных инфекциями, вызванными резистентными микроорганизмами [191].

В 2017 году ВОЗ впервые представила перечень приоритетных патогенов для научных исследований и разработок в сфере создания инновационных антибактериальных препаратов [192].

I. Категория приоритетности:

1. *Acinetobacter baumannii*, устойчивы к карбапенемам,
2. *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивы к карбапенемам,
3. *Enterobacteriaceae*, устойчивы к карбапенемам, вырабатывают бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС);

II. Категория приоритетности:

1. *Enterococcus faecium*, устойчивы к ванкомицину,
2. *Staphylococcus aureus*, устойчивы к метициллину, умеренно чувствительны или устойчивы к ванкомицину,
3. *Helicobacter pylori*, устойчивы к кларитромицину,
4. *Campylobacter* spp., устойчивы к фторхинолонам,
5. *Salmonellae*, устойчивы к фторхинолонам,
6. *Neisseria gonorrhoeae*, устойчивы к цефалоспорином, фторхинолонам;

III. Категория приоритетности:

1. *Streptococcus pneumoniae*, устойчивы к пенициллину,
2. *Haemophilus influenzae*, устойчивы к ампициллину,
3. *Shigella* spp., устойчивы к фторхинолонам.

Многие патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, ассоциированные с инфекционными заболеваниями человека и животных, приобрели множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) и / или полирезистентную лекарственную устойчивость (ПЛУ). В большой степени это связано с широким внедрением во врачебную практику антибактериальных препаратов, а также их доступность в ряде стран в свободной продаже. Особую опасность представляют штаммы *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), который является

социально значимым патогеном и обнаруживается в странах с различным уровнем развития медицинской инфраструктуры [26, 90, 116, 167]. Также особую роль играют полирезистентные бактерии, вызывающие внутрибольничные инфекции. К ним относятся представители родов *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и другие [51].

Развитие суперустойчивости, проявляющейся в резистентности к десяти и более антибактериальным препаратам, в популяции нозокомиальной микробиоты обусловлено постоянным контактом патогенных микроорганизмов с антибактериальными и дезинфицирующими средствами. Примером такого явления может служить микроорганизм *P. aeruginosa*, который находясь в среде с условиями интенсивного воздействия антибиотиков, за счет непрерывных мутаций в геноме, проходит селекцию, направленную на выработку устойчивости к антибактериальным и антисептическим средствам.

Термин «супербактерии» используется для обозначения микроорганизмов, которые обладают повышенной вирулентностью по сравнению с представителями того же вида, что коррелирует с более высокой летальностью среди пациентов, инфицированных этими патогенами. Суперустойчивость связана с множественными мутациями генетического аппарата бактериальной клетки, например, у *K. pneumoniae* это гены - *birA2*, *folP*, *pabC*, *folA*, *gyrB*, *glmM*, *gyrA*, *thyA2* [55, 160], а также с подвижными генетическими элементами - *tetA* и *int1* [133]. Эти факторы обеспечивают полирезистентную антибактериальную устойчивость [133]. Перечень препаратов, способных подавлять рост и размножение этих микроорганизмов, с каждым годом сокращается, а длительность и стоимость лечения таких инфекционных заболеваний увеличиваются [133]. В настоящее время описаны клинические случаи так называемых «супербактерий», которые устойчивы ко

всем антибактериальным препаратам, применяемым для лечения той или иной нозологии [51].

В научной литературе неоднократно встречаются результаты исследований, посвященных изучению резистентности у *S. aureus* [77, 88, 125, 181, 201]. Особое внимание уделяется изучению резистентных типов метициллин- и ванкомицин-устойчивых *S. aureus* (MRSA и VRSA), что связано с невозможностью лечения пациентов стандартными препаратами выбора. Резистентные к пенициллину изоляты *S. aureus* появились вскоре после введения пенициллина для лечения инфекций, вызванных этим микроорганизмом [181]. Менее чем через два десятилетия около 80% клинических изолятов стали устойчивыми к пенициллину в результате приобретения гена *blaZ*, кодирующего фермент бета-лактамазу, инактивирующий пенициллин путем внеклеточного гидролиза бета-лактамного кольца [125, 181]. Ген *blaZ* является частью мобильного генетического элемента, который может быть интегрирован в хромосому или находиться на больших конъюгативных плаزمиде, таких как *IncF* и *IncR* [59], которые, помимо гена *blaZ*, несут устойчивость к тяжелым металлам, а также дополнительные гены устойчивости к антибиотикам — *vanA*, *mecA* и регуляторные гены *mecR1*, *mecI*, *mecC*, *rlmH* [181]. По данным исследования 2016 года, до 99% клинических штаммов *S. aureus* устойчивы к пенициллину, что подчеркивает адаптивную способность *S. aureus* при воздействии сильного селективного давления, такого как антибиотики [33]. Антибактериальный препарат, содержащий метициллин был представлен в конце 1950-х годов для лечения инфекций, вызванных устойчивыми к пенициллину *S. aureus* (PRSA). Несмотря на эффективность метициллина для лечения инфекций PRSA, первые устойчивые к метициллину штаммы *S. aureus* были зарегистрированы в течение двух лет после начала клинического применения [124].

Резистентность к ванкомицину была обнаружена у энтерококков (в том числе *E. faecalis*) в 1980-х годах, и это открытие вызвало серьезные опасения

в отношении будущего использования ванкомицина в качестве эффективного средства для лечения MRSA [124]. О первом изоляте VRSA в США сообщили в 2002 году [42].

Полная устойчивость к ванкомицину у *S. aureus* (МИК ≥ 16 мкг/мл) обеспечивается опероном *vanA*, кодируемым транспозоном *Tn1546*, который изначально входил в состав конъюгативной плазмиды устойчивых к ванкомицину энтерококков (VRE). *S. aureus* может приобретать энтерококковые плазмиды через горизонтальные перенос генов в результате дискретных событий [124].

Ряд научной литературы посвящен исследованию формирования резистентности у энтеробактерий, в первую очередь *E. coli* [63, 102, 135, 172, 185]. Кишечная палочка представляет собой яркий пример микроорганизма, у которого устойчивость к противомикробным препаратам резко возросла из-за повсеместного и нерационального использования антибиотиков: в первую очередь в сельском хозяйстве и медицине [63].

Кишечная палочка (*E. coli*) как человеческого, так и животного происхождения обладает значительным генетическим разнообразием, включающим детерминанты устойчивости к бета-лактамам антибиотикам. В частности, гены, кодирующие бета-лактамазы *blaTEM-1*, демонстрируют высокую частоту встречаемости среди штаммов *E. coli*, выделенных из фекалий животных. В последние несколько лет гены, кодирующие *ESBL/AmpC*, появились уже и у гомогенных штаммов человека [146].

Фторхинолоны (ФХ) представляют собой одну из наиболее часто применяемых групп антибиотиков широкого спектра действия. Они активно используются в клинической практике для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, в частности, *E. coli*. Резистентность к хинолонам чаще всего развивается в результате спонтанных хромосомных мутаций в области, определяющей устойчивость к хинолонам (QRDR) генов, кодирующих ДНК-гиразу или топоизомеразу IV, или в результате точечных мутаций в ДНК-гиразе и плазмид-опосредованных переносов посредством

приобретения детерминант плазмид-опосредованной устойчивости к хинолонам (PMQR), включая *qnrS*, *qnrA*, *qnrB* [63, 83]. Было показано, что детерминанты PMQR сосуществуют с генами резистентности, вызывая устойчивость к другим противомикробным препаратам и, таким образом, делая возможной совместную селекцию [168].

Согласно данным исследования, проведенного Донг Сап Ли, Сэн Джу Ли и Хюн Соп Че, уровень чувствительности *E. coli* к антибактериальным препаратам из класса сульфаниламидов и фторхинолонов составляет около 80%. Однако в отдельных регионах Азии, Ближнего Востока и Средиземноморья наблюдается снижение чувствительности указанных штаммов к данным группам антибиотиков до уровня менее 60% [43, 102]. Южная Азия характеризуется высокой резистентностью штаммов *E. coli* к бета-лактамам, что подтверждается данными, согласно которым более 95% изолятов демонстрируют устойчивость к этим антибиотикам [102]. Однако наблюдается более высокий уровень чувствительности к нитрофурантоину и фосфомицину, превышающий 90% в большинстве стран мира [102].

1. 2. МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Резистентность микроорганизмов к противомикробным препаратам классифицируется на видовую (родовую) и приобретенную. Видовая резистентность обусловлена отсутствием у микроорганизма специфических мишеней для действия лекарственного средства. Приобретенная резистентность формируется в процессе жизнедеятельности микроорганизма и не является характерной для всех его штаммов. Один из механизмов приобретения резистентности — горизонтальный перенос генов, ответственных за устойчивость к антибиотикам [103].

Врожденная резистентность бактерий к определенным группам антибиотиков является эволюционно обусловленным механизмом адаптации. Она может проявляться в виде устойчивости к препаратам пенициллинового ряда у представителей рода *Mycoplasma*. Это связано с отсутствием у данных

микроорганизмов клеточной стенки — структуры, которая является мишенью для пенициллинов. Другим примером врожденной резистентности является устойчивость к ванкомицину у некоторых штаммов лактобацилл. Она обусловлена отсутствием D-аланил-D-аланиновых остатков в субъединицах пептидогликана клеточной стенки. Кроме того, некоторые бактерии могут быть устойчивы к антибиотикам из-за отсутствия метаболического пути или фермента, необходимого для активации препарата. Например, аэробные бактерии могут проявлять устойчивость к метронидазолу из-за отсутствия внутриклеточных транспортных белков, которые участвуют в восстановлении нитрогруппы препарата и его активации [101].

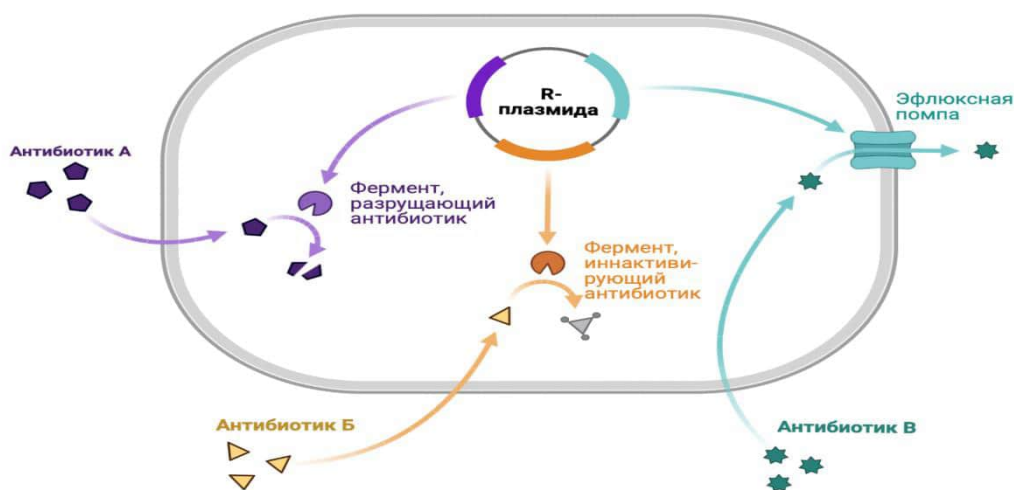


Рисунок 2 – Схематическое изображение наиболее распространённых механизмов антибиотикорезистентности: эффлюксная помпа, ферментативная инактивация (разрушение и инактивация) антибиотика [Автор: А. Н. Сенягин (BioRender, 2022 г.)]

Примечание: Антибиотик А, Б, В – условное обозначение, без конкретизации

Антибиотикорезистентность представляет собой адаптивное свойство бактерий, проявляющееся в их способности противостоять воздействию антибиотиков. Механизмы приобретенной антибиотикорезистентности многообразны и включают модификацию целевого сайта действия антибиотика, модификацию или разрушение самого антибиотика, активный выброс антибиотика с помощью белков-транспортеров, а также снижение

проницаемости клеточной мембраны для антибиотика (Рисунок 2). Эти механизмы могут функционировать как изолированно, так и в различных комбинациях, обеспечивая высокую степень резистентности к множественным группам антибиотиков одновременно [36, 124, 159, 180].

Эффлюксная помпа представляет собой комплекс трансмембранных белков, обеспечивающий активный транспорт различных соединений из клетки. В частности, она отвечает за выведение метаболитов, антибиотиков и тяжелых металлов. Структура эффлюксной помпы включает белок внешней мембраны, белок периплазматического пространства, белок цитоплазматической мембраны и трансмембранный проток [117].

Эффлюксные помпы активно транспортируют небольшие молекулы из бактериальной клетки. Помпы могут перемещать различный объем субстрата и иметь определенную специфичность. Система эффлюкса тетрациклина является одной из первых идентифицированных систем устойчивости к этому антибиотику и остается одним из ключевых факторов, определяющих устойчивость бактерий к тетрациклину. Установлено, что некоторые помпы, участвующие в эффлюксе, способны элиминировать широкий спектр субстратов, что обуславливает их роль в формировании множественной лекарственной устойчивости. Этот механизм резистентности наблюдается как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий [117, 139]. Помпы подразделяются на пять основных семейств, которые отличаются друг от друга по структуре, источнику энергии, специфичности субстрата и распространению видов [117].

Эволюция различных механизмов резистентности значительно усложняет борьбу с патогенами. Например, экспрессия эффлюксных помп вызывает затруднение для проникновения лекарственных средств в бактериальные клетки и достижения бактерицидных концентраций [133]. Некоторые виды бактерий, такие как *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* и *M. tuberculosis*, способны изолироваться внутри макрофагов человека [171]. Другие виды, включая *P. aeruginosa*, *E. coli* и *A. actinomycetemcomitans*,

формируют биопленки, что приводит к развитию персистирующих инфекций [141, 190]. Это особенно актуально для рецидивирующих бактериальных циститов, уретритов и пародонтитов, которые трудно поддаются лечению традиционными противомикробными препаратами.

Поддержание низких внутриклеточных концентраций антибактериальных препаратов может быть достигнуто за счет снижения проницаемости клеточной мембраны бактерий. Это включает уменьшение диаметра пор, количества трансмембранных каналов или мутации поринов, что препятствует проникновению антибиотиков внутрь клетки. Сниженная экспрессия поринов или мутированные порины без экспрессии карбапенемаз были детально изучены у ряда грамотрицательных патогенов, таких как карбапенем-резистентные штаммы *Enterobacter*, *E. coli* и *K. pneumoniae* [159].

Мутации или модификации сайтов связывания мишеней антибиотиков являются распространенным защитным механизмом, используемым бактериями для приобретения резистентности [133]. Макролиды и родственные им антибиотики осуществляют свое действие путем связывания и последующего ингибирования пептидилтрансферазной активности 50S – субъединицы рибосомы. Резистентность к данной группе антибиотиков обычно развивается вследствие модификации РНК или пептидных компонентов туннеля 50S – субъединицы рибосомы [51, 133].

Мутации в генах-мишенях бактериальной гиразы и активный отток фторхинолонов из клетки являются ключевыми факторами, способствующими развитию устойчивости к этим препаратам. Кроме того, существует трансмиссивный механизм инактивации фторхинолонов, который включает фермент аминогликозид-N-ацетилтрансферазу [51]. Этот фермент модифицирует вторичный амин в структуре фторхинолонов, что приводит к утрате их активности. Еще один механизм резистентности, обусловлен геном *Qnr*, который отвечает за синтез белков, способных конкурентно связываться с ДНК-гиразой, препятствуя ее взаимодействию с фторхинолонами [51].

Антибиотикорезистентность часто возникает в результате однонуклеотидного полиморфизма, вызывающего точечные аминокислотные мутации в белках, таких как SPBs и AlbA, которые являются мишенями для фторхинолонов. Этот механизм классифицируется как спонтанная приобретенная резистентность. Данный тип резистентности характерен для патогенных микроорганизмов, поражающих человека, и обусловлен воздействием низкомолекулярных антибиотиков таких как, пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины, фторхинолоны и макролиды (непептидные антибиотики) [188].

1. 3. БИОПЛЕНКИ КАК ФАКТОР АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ранее были рассмотрены основные механизмы формирования антибиотикорезистентности у микроорганизмов. Помимо известных механизмов, таких как мутации, горизонтальный перенос генов и активный выброс антибиотиков, бактерии также развивают устойчивость через образование биопленок. Данный процесс имеет сложную структуру и его устройство представляет собой многоуровневую систему взаимодействия микроорганизмов. Эволюционно биопленкообразование помогает микроорганизмам выживанию в неблагоприятных условиях. Биопленки формируются в результате адгезии бактериальных клеток к поверхностям, что приводит к образованию многослойных структур, устойчивых к физическим и химическим воздействиям. В условиях увеличения средней продолжительности жизни и старения населения, а также роста числа хронических заболеваний, проблема инфекционных заболеваний, ассоциированных с образованием биопленок, становится все более актуальной. К таким заболеваниям относятся остеомиелит, эндокардит, инфекции, связанные с наличием инородных тел, таких как кардиостимуляторы и ортопедические протезы [53, 87, 184]. Это способствует не только увеличению распространенности биопленок, но и усложняет

лечение инфекций, требуя применения более агрессивных и дорогостоящих терапевтических подходов [53].

Формирование биопленок на поверхности имплантируемых кардиостимуляторов и ортопедических протезов, а также развитие у микроорганизмов устойчивости к антибиотикам, доступных как в аптечной сети, так и в медицинских учреждениях, представляют значительный научный интерес. Для выживания в условиях окружающей среды, включая защиту от антибиотиков и дезинфицирующих средств, микроорганизмы формируют особую структуру — биопленку [200].

Биопленкообразование является динамичным процессом, который регулируется через механизм кворум-сенсинга (QS), а также воздействием внешних факторов, таких как доступность питательных веществ, гидродинамические условия окружающей среды, температура, pH, гравитационные силы, броуновское движение, природа обитаемых поверхностей, вторичные мессенджеры, сигнальные молекулы, синтезируемые микроорганизмами и межклеточные взаимодействия между бактериями, как внутри монокультур, так и между представителями различных видов. Ключевую роль в биопленкообразовании играют сигнальные каскады, активируемые молекулами QS – системы [200].

Таким образом, формирование биопленок это многостадийным и сложный процесс, включающий переход бактерий из свободной планктонной формы к адгезивному состоянию. Этот этап является начальным в формировании биопленки. Адгезия микроорганизмов к поверхностям инициируется за счет факторов адгезии, таких как пили I типа, липотейхоевые кислоты и белки наружной мембраны. Данный процесс рассматривается как ключевой этап трансформации свободно расположенных микроорганизмов в организованную структуру сообщества [141]. При этом, в самом начале формирования биопленки, микроорганизмы свободно и обратимо прикрепляются к поверхностям, и эта стадия характеризуется наличием полярно прикрепленных к поверхностям бактериям. Продолжая этап адгезии,

микроорганизмы меняют ориентацию в пространстве, уже располагаясь горизонтально по отношению к поверхности и переходят к необратимому прикреплению, которое способствует развитию устойчивости ко многим физическим факторам, препятствующим образованию биопленки [141]. Бис-(3'-5') – циклический димер – гуанозинмонофосфат (с – di – GMP) представляет собой внутриклеточную сигнальную молекулу, которая играет важную роль на ранних стадиях формирования биопленки, ограничивая подвижность, опосредованную жгутиками, и увеличивая продукцию матрикса бактериальной клеткой [200]. Концентрация, ранее упомянутого с – di – GMP, увеличивается с каждым событием прикрепления / отсоединения из-за системы поверхностного восприятия Pil – Chp, присутствующей на микробных поверхностях. Таким образом, начальные этапы биопленкообразования включают в себя переход клеток из поверхностно-расположенных (бактерии, которые демонстрируют низкую концентрацию с – di – GMP и изначально не соприкасаются с поверхностями) в поверхностные клетки (бактерии, которые демонстрируют высокую концентрацию с – di – GMP, GMP и изначально соприкасаются с поверхностью) и в дальнейшем необратимо прикрепляются к поверхностям, что приводит к образованию биопленок (Рисунок 3) [200].

Инфекции, ассоциированные с формированием биопленок, часто вызываются коагулазопозитивными штаммами *S. aureus* или коагулазонегативными *S. epidermidis*. Лечение таких инфекций является сложным и дорогостоящим, требующим длительного применения антибиотиков и зачастую хирургического удаления инфицированного имплантата.

Исследование, включавшее анализ данных о 14 378 пациентов, перенесших первичное эндопротезирование коленного или тазобедренного сустава, выявило, что у 3,8% пациентов (542 из 14 378) был зафиксирован хотя бы один эпизод выраженной бактериемии. Из них у 8,3% (45 из 542) развилась инфекция протезированного сустава в период бактериемии. Наиболее частым

возбудителем был *S. aureus*, при этом 21% инфекций были связаны с бактериемией [84].

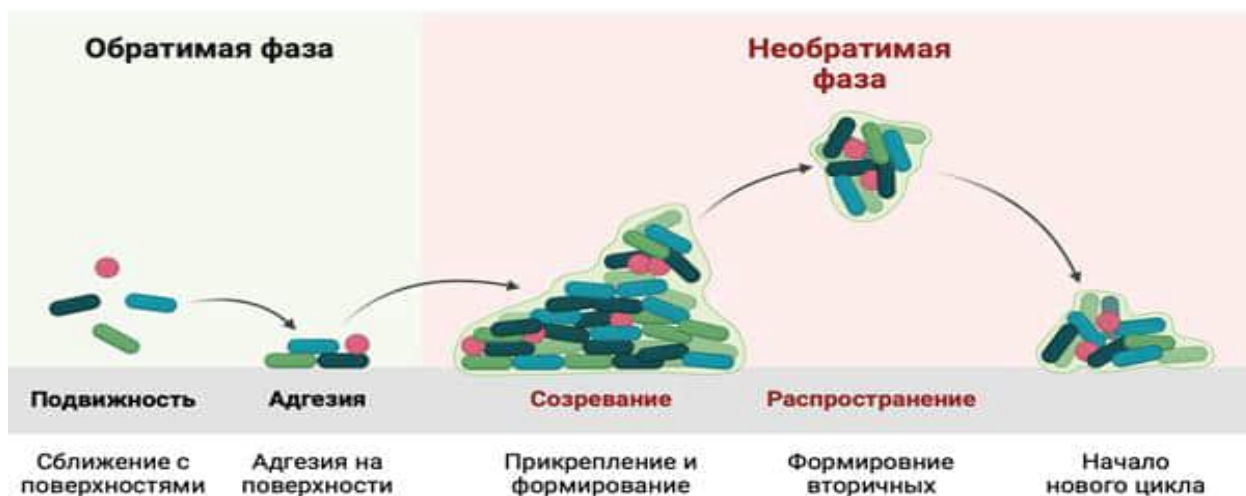


Рисунок 3 - Схематическое изображение поэтапного формирования бактериальной биопленки на поверхности [200]

Представляя собой высокоорганизованные микробиологические сообщества, фиксированные на различных поверхностях и погруженные в матрикс экзополисахаридов, биопленки демонстрируют повышенную устойчивость к антибиотикам, что способствует формированию резистентных штаммов микроорганизмов, играя ключевую роль в патогенезе заболеваний, порчи пищевых продуктов и создавая значительные риски для здоровья человека, ветеринарии и пищевой промышленности [200].

1. 4. ПРИЧИНЫ И МЕХАНИЗМЫ РАСПРОСТРАНЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Одной из причин быстрого роста количества антибиотикорезистентных патогенных микроорганизмов является горизонтальный перенос генов, множественные механизмы которого освобождают гены от нормального вертикального наследования в потомстве [103]. Горизонтальный перенос генетического материала, осуществляемый посредством плазмид в процессе конъюгации, бактериофагов в ходе трансдукции и внеклеточной ДНК в результате естественной трансформации, обеспечивает передачу генетической информации между штаммами и видами как внутри одного

биоценоза, так и между различными биоценозами в пределах одного организма [103].

Важно отметить, что горизонтальный перенос генов может привести к быстрой адаптации патогенов к среде с высокой концентрацией антибиотиков [147]. Эти адаптации могут быть в форме приобретения активной вирулентности или новых метаболических путей [191].

Горизонтальное распространение генов устойчивости к антибиотикам среди бактерий в основном находится под управлением плазмидного аппарата бактериальной клетки. Важно отметить, что существуют особые ассоциации между резистентными плазмидами и бактериальными клонами, которые часто обнаруживаются в условиях лечебных учреждений. Однако факторы, лежащие в основе успеха этих ассоциаций, остаются неизвестными [128].

Исследования, проведенные в 2018 году, показывают, что плазмиды, кодирующие гены антибиотикорезистентности, вызывают определенные энергетические затраты на приспособление у бактерий и что эти затраты со временем снижаются, в связи с компенсаторными мутациями. Сразу после конъюгации энергозатраты бактериальной клетки резко возрастают, что может препятствовать ее дальнейшему делению. Однако, в ряде случаев в приобретенной плазмиде происходят компенсаторные мутации, снижающие энергетические затраты клетки, и приводящие к наложению гена антибиотикорезистентности. Возможно, что именно последующая компенсационная адаптация определяет успех ассоциаций между плазмидами и бактериями в клинических условиях, формируя эволюцию устойчивости к антибиотикам *in vivo* [151].

Помимо этого, классического механизма, появляются новые механизмы горизонтального переноса генов. Так в 2017 году группой ученых А. В. Westbye, J. T. Beatty, A. S. Lang были обнаружены генетические элементы, универсальные для процессов трансдукции и трансформации [189]. Мембранные везикулы (MVs), образуемые из мембраны бактериальной клетки, демонстрируют способность транспортировать генетический

материал, включая хромосомную и плазмидную ДНК, а также разнообразные типы РНК. Этот механизм рассматривается как один из вариантов горизонтального переноса генов [189]. В 2019 году были описаны два новых конъюгативных метода, а именно хромосомный перенос с участием микоплазмы [58] и распределительный конъюгативный перенос [71]. Также горизонтальный перенос генов может осуществляться с помощью трансъюгации - гибридном механизме, обнаруживаемом при трансформации и конъюгации [30, 31]. Вышеизложенные способы горизонтального переноса генетической информации еще более сложны, чем конъюгация или трансформация поскольку сами мобильные генетические элементы, такие как IS - элементы или транспозоны, ретротранспозоны могут быть интегрированы в плазмиды или даже в другие транспозоны [159].

Стратегии минимизации последствий развития устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам в окружающей среде сводятся к предотвращению условий, способствующих отбору, мобилизации и сохранению генов устойчивости в бактериальных сообществах, а также к сокращению путей распространения устойчивых бактерий, включая микробиом человека. Ограничение использования антибиотиков у людей и животных является важным аспектом этой стратегии. Разнообразие генов устойчивости в окружающей среде указывает на наличие значительного числа потенциальных генов, которые могут быть мобилизованы патогенами. Даже при отсутствии селективного давления антибиотиков, гены резистентности, уже распространенные среди бактериальных популяций в микробиоме человека, вероятно, не будут полностью искоренены. Это означает, что мобильные гены устойчивости, циркулирующие среди патогенов человека, могут быстро восстанавливаться после лечения антибиотиками. С другой стороны, появление дополнительных генов устойчивости у патогенов может иметь разрушительные последствия для здоровья человека, поскольку мобильные гены устойчивости к новым антибиотикам дополнительно ограничивают возможности лечения инфекционных заболеваний.

1. 5. ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ – АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПОДХОД К АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ

С учетом создания новых антибактериальных препаратов развитие устойчивости бактерий к разработанным антибиотикам начнется с первых месяцев применения. Введение и реализация программ рационального использования антибиотиков имеет одно из решающих значений для сведения к минимуму вероятности развития антибиотикорезистентности. В основе таких программ лежат следующие принципы: (1) антибиотики следует использовать при наличии признаков бактериальной инфекции, чтобы свести к минимуму ненужное воздействие препаратов на пациентов; (2) бессимптомное бактерионосительство условно-патогенных возбудителей не следует лечить (если нет фактора риска), чтобы свести к минимуму ненужное воздействие антибиотиков; (3) обязательное определение чувствительности к противомикробным препаратам при выявлении патогена; (4) использование доз противомикробных препаратов, утвержденных клиническими рекомендациями для лечения конкретного инфекционного заболевания; (5) использование антибиотиков в течение соответствующей продолжительности для уменьшения рецидива. Существует необходимость запрета антибиотиков как препаратов для самостоятельного лечения. Также следует уделить особое внимание мерам и средствам индивидуальной защиты, особенно лицам, которые путешествуют в эндемичных районах или периодически находятся в условиях высокого риска контакта с полирезистентными микроорганизмами, в частности нозокомиальными. Данные рекомендации теоретически могут снизить распространение полирезистентных микроорганизмов.

Поиск новых лекарственных препаратов и методов лечения инфекционных процессов, кроме описанных выше проблем, также связан с многими рисками для самого пациента. Идеальный антибиотик нетоксичен для клеток макроорганизма, легко проникает в бактериальные клетки и накапливается исключительно в месте инфекции в высоких концентрациях. Согласно мнению разных коллективов ученых, препараты узкого спектра

действия могут иметь преимущества, поскольку они могут ограничивать развитие резистентности и оставлять комменсальный микробиом хозяина нетронутым [109].

Стратегией преодоления персистирующих инфекций и борьбы с резистентными микроорганизмами является использование конъюгатов антибиотиков. Конъюгаты позволяют временно маскировать активность за счет расщепляемой связи пролекарства (неактивная при введении лекарственная субстанция, при метаболизме которой переходит в активную форму), направленной доставки лекарственного средства посредством конъюгации, улучшенных фармакокинетических (метаболизм лекарственного препарата) и фармакодинамических (механизм действия на мишени клеток организма или микроорганизмов) профилей или их комбинации.

Еще одно из перспективных исследований связано с так называемыми ингибиторами устойчивости к антибиотикам, способными повторно сенсibilизировать устойчивые бактерии к антибактериальным препаратам. Хотя некоторые ингибиторы устойчивости к антибиотикам ранее использовались в клинических условиях, такие как ингибиторы β -лактамаз (BLIs) или как ранее их называли адъюванты антибиотиков, примером которых может служить клавулановая кислота, используемая и по сей день, возможно, что более широкая область исследований ингибиторов устойчивости к антибиотикам может дать большее разнообразие более эффективных терапевтических субстанций, чем это было достигнуто ранее [109].

В качестве альтернативных и эффективных вариантов борьбы с суперрезистентными бактериями могут быть препараты, полученные из растений, обладающие большим спектром химиотерапевтических средств в форме их вторичных метаболитов, способных бороться с бактериальными инфекциями, вызванными суперрезистентными бактериями [14, 15]. Эти фитохимические вещества включают в себя алкалоиды, флавоноиды, хиноны, кумерины и многие другие [14, 15]. Применение фито экстрактов показывает

антибактериальный эффект, в том числе и активность в отношении биопленок [22, 89].

Например, алкалоиды продемонстрировали противомикробную активность широкого спектра действия *in vitro*, и несколько исследований показали, что эти соединения могут играть важную роль в борьбе с различными инфекционными агентами [39, 111, 202]. Некоторые синтезированные аналоги алкалоида пиперина, такие как этиловый эфир 5-(2,2-диметил-хроман-6-ил)-4-метил-пента-2,4-диеновой кислоты 5 и 5-(2,2-диметил-хроман-6-ил)-4-метил-2E,4E-пентадиеновая кислота пирролидид показали способность ингибировать экспрессию гена *NorA* при исследовании на *S. aureus* [45].

Но не все фитохимические соединения, обладающие выраженным антибактериальным действием, были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA). К таким веществам относятся кодеин, капсаицин, резерпин, паклитаксел и колхицин. Это связано с их недостаточной эффективностью и высоким риском побочных эффектов [89].

Синтез наночастиц является еще одним направлением в исследованиях, направленных на борьбу с антибиотикорезистентностью. Наноматериалы, обладающие уникальными физико-химическими свойствами, вызывают значительный интерес в научном сообществе благодаря своему потенциалу в преодолении устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам.

Среди различных типов наноматериалов, исследуемых в данном контексте, можно выделить липосомы, дендримеры, а также наночастицы на основе оксидов металлов, таких как цинк, серебро и золото. Особое внимание уделяется твердым липидным наночастицам [132]. Некоторые наночастицы способны прикрепляться непосредственно к клеточной стенке микробов, поэтому нет необходимости проникать внутрь клетки, а наночастицы на основе оксидов металлов проявляют бактерицидные свойства, благодаря способности генерировать образование активных форм кислорода [78].

Некоторые наночастицы, включая наночастицы серебра (AgNP), обладают как положительными, так и отрицательными свойствами. В рамках серии исследований были проведены эксперименты по интраназальному введению наночастиц серебра крысам. Результаты показали, что частицы серебра проникают в различные органы и ткани, включая лимфатические узлы, печень, почки, селезенку и центральную нервную систему. Наблюдались признаки цитотоксического эффекта в местах накопления наночастиц. При повторном интраназальном введении было зафиксировано развитие пневмонии и отека легких [79, 112].

Можно предположить, что химический синтез [129, 145], и достижения в области доставки фармацевтических субстанций [45] всегда будут служить основой разработки антибиотиков. Возможным перспективным направлением преодоления антибиотикорезистентности станет поиск фармацевтических субстанций среди естественных природных антагонистов. Синергическая комбинированная терапия будет играть важную роль в антибиотикотерапии будущего, поскольку она позволит как преодолеть установленную резистентность, так и отсрочить появление новых механизмов резистентности.

1. 6. ГРИБЫ РОДА *TRICHODERMA* КАК ПРОДУЦЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Грибы рода *Trichoderma* являются одним из наиболее изучаемых родов плесневых грибов в мире. При запросе ключевого слова «*Trichoderma*» в поисковой строке базы данных PubMed (NCBI, США), система обнаруживает более 18800 статей и исследований, первая из которых была опубликована в 1794 году. По данным литературы, это единственный род грибов, у которого есть полногеномная последовательность в Генетическом банке для каждого из известных видов [92]. По информации, предоставленной Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI, США), были секвенированы 35 полногеномных последовательностей, относящихся к представителям данного рода. В контексте современных генетических исследований особый интерес представляет изучение геномов с целью

выявления генов, кодирующих синтез биологически активных соединений, и последующего их переноса в другие микроорганизмы [71, 137, 178].

Грибы рода *Trichoderma* – выделенные и описанные немецким микологом С. Н. Persoon [138] в 1794 году, относятся к несовершенным грибам семейства *Hypocreaceae*. Полная таксономия гриба: Домен – *Eukaryota*; Царство – *Fungi*; Тип – *Ascomycota*; Класс – *Sordariomycetes*; Порядок – *Hypocreales*; Семейство – *Hypocreaceae*. Род *Trichoderma* включает 100 видов. Представители данного рода характеризуются сапрофитным и фитопатогенным образом жизни, однако многие виды способны к паразитированию на аскомицетах и даже на филогенетически родственных видах [154].

Конидиофоры у представителей рода *Trichoderma* разветвлены. Могут располагаться рыхло или быть компактно собраны в пучки, часто формируются в виде отчетливых концентрических колец или располагаются вдоль скудных воздушных гиф. Основные ветви конидиофоров, как правило, дают боковые ответвления, которые могут быть парными и непарными, причем самые длинные ответвления удалены от апикального конца гифы, а часто фиалиды отходят непосредственно от главной оси апикального конца. Гифы могут повторно разветвляться, при этом вторичные гифы чаще парные, а самые длинные вторичные гифы находятся ближе всего к главной оси. Все первичные и вторичные гифы возникают под углом близком к 90° по отношению к главной оси основной гифы. Типичный конидиофор *Trichoderma* с парными гифами принимает пирамидальную форму. Обычно конидиофор оканчивается одним или несколькими фиалидами. Основная ось может быть такой же ширины, как и основание фиалида, или может быть значительно шире.

Представители рода *Trichoderma* обнаруживаются в почве и воде. Они распространены на территории Северной Америки, Европы, Азии и многих биомов России. Особенно высокое разнообразие этих микроорганизмов наблюдается в регионах средней Сибири [6].

Для видов рода *Trichoderma* характерны экологической пластичностью и способность к росту на субстратах с низким содержанием питательных веществ. В лабораторных условиях для их культивирования успешно используются агаризованные среды, такие как картофельно - декстрозный агар. Температурным оптимумом для большинства видов является диапазон от 24° до 28° С. Грибы рода *Trichoderma* демонстрируют уникальную способность к синтезу широкого спектра биологически активных метаболитов. Эти метаболиты включают как конститутивные, так и индуцибельные соединения, такие как поликетиды, алкалоиды, терпеноиды и ферменты [154, 198]. Эта особенность привлекла внимание исследователей и способствовала интенсивному изучению представителей данного рода. Согласно литературным данным, грибы рода *Trichoderma* синтезируют более 203 различных метаболитов [198].

Основные группы органических метаболитов грибов рода *Trichoderma*: виолацеолы, гарцианумы, глиовирин, дитиоаспергиллазин А, йоддитиобревамины, кремнеолиды, конингинины, неомacroфорины, триходермарины G–N, трихотецинол, триходермолы, триходермины, триходерминол, триходермарины А и В, трихобреолы, трихокаратиноиды, триходермалоиды, трирокадинины, трихокупарины, циклопептиды, претриходермамид А, триходермамид А, триходиолы, цитриновирин, 5-эпипретриходермамид А, 5-эпи-претриходермамид А, циклоспорин А, хлортритиобревамины [54, 80, 161 – 163, 154].

В рамках современных научных исследований наиболее часто упоминаются три вида рода *Trichoderma*:

1. *Trichoderma viride* [80]
2. *Trichoderma koningii* [105]
3. *Trichoderma harzianum* Rifai [10]

Виды *T. harzianum*, *T. longibrachium*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. koningii* рода *Trichoderma* имеют широкое распространение и важное значение в сельском хозяйстве и биотехнологии, это связано с их способностью как

подавлять почвенные фитопатогенные микроорганизмы, так и стимулировать рост и развитие растений [1, 4 – 10, 20, 25, 97].

Грибы рода *Trichoderma* является одним из наиболее перспективных непатогенных микроорганизмов для применения в «зеленых» биотехнологиях. Эти технологии основаны на использовании экстрактов растений и грибов для синтеза различных субстанций. Их потенциал обусловлен широким спектром синтезируемых соединений, что открывает значительные возможности для инновационных решений в различных областях [97].

Межвидовая конкуренция и антагонизм представляют собой феномены, получившие значительное освещение в научной литературе. Эти процессы активно исследуются на протяжении длительного времени и находят широкое применение в различных сферах человеческой деятельности, включая здравоохранение, сельское хозяйство и другие области. Антибактериальные препараты, основанные на веществах, синтезируемых микроорганизмами и подавляющих рост или размножение других микроорганизмов, широко применяются в различных областях. В природных условиях эти биологически активные соединения направлены на конкурентное взаимодействие с другими организмами в определенной экологической нише. Род *Trichoderma* известен своей способностью к синтезу веществ с бактерицидным или бактериостатическим действием. К таким соединениям относятся хитиназа, целлюлоза, ферменты, расщепляющие сложные полисахариды, а также глиотоксин и виридин, обладающие антимикробной активностью [17, 32, 38, 95, 97, 176].

В ряде предыдущих исследований накоплен значительный объем информации о способности грибов рода *Trichoderma* к синтезу биологически активных соединений, обладающих выраженным антагонистическим действием в отношении различных микроорганизмов, включая плесневые и дрожжевые грибы, а также патогенные бактерии [85, 86]. Эти данные свидетельствуют о перспективности использования представителей рода

Trichoderma в качестве продуцентов новых биоактивных веществ, которые могут найти применение в борьбе с инфекционными заболеваниями.

В Российской Федерации и за рубежом в сельском хозяйстве широко используется ряд биопрепаратов, содержащих представителей грибов рода *Trichoderma*. Первым в России стали использовать биопрепарат, созданный на основе *T. viride*, который был создан в ВИЗРе в 60-е годы прошлого века. Позже список препаратов был значительно пополнен, а в качестве продуцентов были использованы *T. harzianum*, *T. aspergillum*, *T. koningii* и др [3, 5]. В настоящее время на территории РФ используется несколько сельскохозяйственных препаратов на основе метаболитов грибов *T. harzianum*, зарегистрированных под названиями «Стернифаг» (ЗАО «Агробиотехнология») и «Глиокладин» (АБТ-групп) [7, 8]. Зарегистрированы также комбинированные препараты на основе субстанций, продуцируемых грибами этого рода в комбинации с другими микроорганизмами.

Биологически активные метаболиты, продуцируемые грибами рода *Trichoderma*, находят широкое применение в различных отраслях промышленности. В легкой промышленности они используются для обработки текстильных материалов, в химической промышленности — для производства разнообразных химических препаратов, в пищевой промышленности — для ферментации пищевых продуктов, а также в сельском хозяйстве — для создания органических удобрений. В медицине метаболиты гриба рода *Trichoderma* применяются для синтеза антибиотиков и ферментов, что способствует разработке новых терапевтических препаратов [52, 76, 110, 182].

Ферменты, продуцентами которых являются микроорганизмы, имеют целый ряд преимуществ по сравнению с веществами другого происхождения. К такого рода преимуществам можно отнести:

1. Возможность использовать один вид продуцента для получения широкого спектра веществ;

2. Продуценты культивируются на простых средах, которые имеют относительно невысокую стоимость и просты в приготовлении;

3. Большинство продуцентов характеризуются коротким временем генерации, что обеспечивает возможность получения значительного объема биомассы в кратчайшие сроки;

4. Индуцибельность биосинтеза ферментов у микроорганизмов представляет собой важный аспект их метаболизма. Условия культивирования могут существенно влиять на экспрессию генов, ответственных за синтез необходимых ферментов. Это открывает широкие возможности для биотехнологического применения, позволяя целенаправленно регулировать и оптимизировать процессы ферментации для получения целевых продуктов;

5. Экзоферменты локализуются за пределами клеточной мембраны продуцента, что существенно упрощает их экстракцию и открывает перспективы для создания систем непрерывного культивирования с устойчивым выходом целевого продукта. Замена отработанной культуральной среды на свежую может осуществляться непрерывно, что способствует поддержанию оптимальных условий для биосинтеза;

6. Возможность создания продукта с использованием микроорганизма-продуцента, подвергнутого генетической трансформации, для увеличения его выхода [92, 110].

В последние годы в биотехнологической промышленности все чаще можно встретить использование микроскопических грибов [186], которые обладают высокой способностью к синтезу ряда биологических субстанций, таких как виридин, глиотоксин, хитиназа [17, 32, 38, 95, 97, 176] или биосурфактанты: софоролипиды, липиды маннозилэритрита, липиды целлобиозы, ксилолипиды, полиоллипиды и гидрофобины, которые уже нашли практическое применение [41, 47]. Также существует ряд ферментов, используемых в пищевой и целлюлозно-бумажной промышленности [149, 150]. Нашли свое применение ферменты и в производстве моющих средств, в

синтезе спиртов, преобразовании отходов [149, 150], получении кормовых добавок для сельского хозяйства и в текстильной промышленности [41, 150].

В ряде научных публикаций освещается вопрос о полисахаридах, выделенных из штаммов гриба рода *Trichoderma*, которые демонстрируют противоопухолевые и антиоксидантные свойства [91, 115]. Некоторые полисахариды этого гриба способны ингибировать ферменты быстро делящихся эукариотических клеток, а также обладают цитотоксическим действием [90], например, полисахариды EPS1, EPS2 и IPS, TM1 и TM2 [88, 106].

Микроскопические грибы представляют собой источник ферментов, которые находят широкое применение в различных областях медицины и биотехнологии (Таблица 2) [69, 82, 167].

Особого внимания заслуживает тот факт, что ферменты хитиназы, вырабатываемые грибами рода *Trichoderma*, демонстрируют ярко выраженную антигрибковую и антибактериальную активность. Это свойство не характерно для ферментов хитинолитического ряда, синтезируемых другими представителями грибного царства [49, 82]. В связи с этим хитиназы, продуцируемые грибами рода *Trichoderma*, а также кодирующие их гены, представляют значительный интерес для фундаментальных и прикладных исследований.

Циклоспорин А, который синтезируется *T. polysporum* Rifai, является ключевым метаболитом с выраженным биологическим действием. Он эффективно подавляет рост и размножение патогенных грибов, а также проявляет антипаразитарную, противовоспалительную и иммуносупрессивную активность. В современной медицине циклоспорин А широко применяется как иммуносупрессивное средство. Его используют для предотвращения реакции «трансплантат против хозяина» при трансплантации органов, а также для лечения различных аутоиммунных заболеваний, включая псориаз.

Таблица 2 – Метаболиты микроорганизмов, используемые в медицине

Продуцируемый метаболит	Продуцент	Применение в медицине
Декстриназа	<i>Pichia pastoris</i>	предотвращение кариеса зубов [131]
Ферменты, обладающие протеолитической активностью (протеазы)	<i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Ganoderma lucidum</i>	терапия воспалительных процессов и ожогов [68, 107]
Стрептокиназа	<i>Pichia pastoris</i>	Применяется при тромбообразованиях, тромбозах крупных и мелких сосудов [11, 194]
Фенилаланинаммиаклиаза, уратоксидаза, липопротеидлипаза, холинэстераза	<i>Trichoderma</i> spp.	Лечение болезней накопления, например, фенилкетанурии [64, 71]
Аргиназа, РНК-аза, L-аспарагиназа, глутаминаза, гистидаза, треонингидратаза	<i>Neurospora intermedia</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Trichoderma</i> spp., <i>Yarrowia lipolytica</i> ,	Применяются в заместительной терапии [37, 65, 71, 130, 194], а также в онкотерапии [48, 49, 157, 193, 194]

Циклоспорин А оказывает супрессивное действие, подавляя Т-лимфоцитзависимую продукцию антител и лимфокинов, а также ингибируя их последующее высвобождение. Препарат блокирует лимфоциты в фазе G0 или G1 клеточного цикла [56, 176].

В большинстве научных публикаций рассматриваемые соединения демонстрируют биологическую активность, включая противомикробные, противоопухолевые и ингибирующие свойства. В соответствии с литературными данными, 73,40% изученных метаболитов продемонстрировали биологическую активность. Значительная часть из них показала активность, превосходящую таковую у положительных контролей [197]. Например, трихотецены 22 и 23, выделенные из морского штамма *T. longibrachiatum* показали в два раза более высокую противогрибковую активность в отношении *C. lagrnarium*, чем положительный контроль, в качестве которого использовали синтетический фунгицид карбендазим (эквивалентные МИК были при концентрациях 16 мкг/мл и 32 мкг/мл соответственно) [28]. Также выраженную цитоксическую активность показал в исследованиях циклопентенон 183 в отношении опухолевых линий, таких как HeLa и A549 (IC50-функциональная активность ингибитора для этих двух клеточных линий составляла 85,6 и 50, 2 соответственно), тогда как он был неактивен в отношении неопухолевой линии клеток легких [197]. Высокая биологическая активность свидетельствует о возможности использования этих соединений в качестве перспективных фармакологических агентов для разработки новых лекарственных препаратов.

Перспективным направлением является использование ксиланаз грибов рода *Trichoderma* для синтеза наночастиц серебра из растительных экстрактов. Полученные наночастицы серебра обладают выраженной антибактериальной активностью, которая проявляется в диапазоне от 69,2 до 80,1% при концентрации 100 мкг/мл. Кроме того, они демонстрируют ярко выраженную антикоагулянтную активность, вызывая растворение тромба в течение 5 минут в условиях *in vitro* [62].

Грибы рода *Trichoderma* представляют значительный интерес в контексте биосинтеза L-лизин- α -оксидазы (LO). Данный фермент был впервые выделен из водного экстракта гриба *T. viride* Pers ex S.F. Gray и описан японскими исследователями Кусакабе С. и Кусакабе Х. в 1979 году [99, 100].

Через 9 лет было установлено, что LO ингибирует рост лейкемических клеток мыши как *in vivo*, так и *in vitro* [99].

1. 7. L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗА – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA*

L-лизин- α -оксидаза - фермент с кодовым номером КФ 1.4.3.14, относящийся к классу оксиредуктаз. Впервые был выделен в 1979 году группой японских ученых из грибов рода *Trichoderma*: *T. viride* Y244 – 2 [100]. Позже в Советском Союзе (СССР), был выделен другой штамм вида *T. harzianum* Rifai F-180, продуцирующий фермент L-лизин- α -оксидазу [5].

Фермент L-лизин- α -оксидаза, выделенный из штамма *T. viride*, представляет собой белок, состоящий из 540 аминокислотных остатков. В нативной форме фермент существует в виде гомодимера. Синтез фермента начинается с образования белка-предшественника, содержащего 617 аминокислотных остатков, из которых N-концевые 77 остатков подвергаются протеолитическому удалению в процессе созревания. Фермент проявляет высокую термостабильность, сохраняя более 90% своей исходной активности после инкубации при 60°C в течение 30 минут в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4). Стабильность фермента также сохраняется в широком диапазоне рН, от 7 до 10, что свидетельствует о его устойчивости к изменениям кислотно-щелочного баланса [14]. Структурно фермент L-лизин- α -оксидаза состоит из двух белковых субъединиц, соединенных между собой (Рисунок 4) [5]. Молекулярная масса фермента составляет 138.99 кДа.

Фермент L-лизин- α -оксидаза катализирует реакцию окислительного дезаминирования незаменимой аминокислоты L-лизина с образованием четырех продуктов реакции: - α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты, аммиака, Δ^7 -пиперидин-2-карбоновая кислота (которая может переходить обратно в α -кето- ϵ -аминокапроновую кислоту) и перекиси водорода, саму же реакцию можно представить в виде схемы (Рисунок 5).

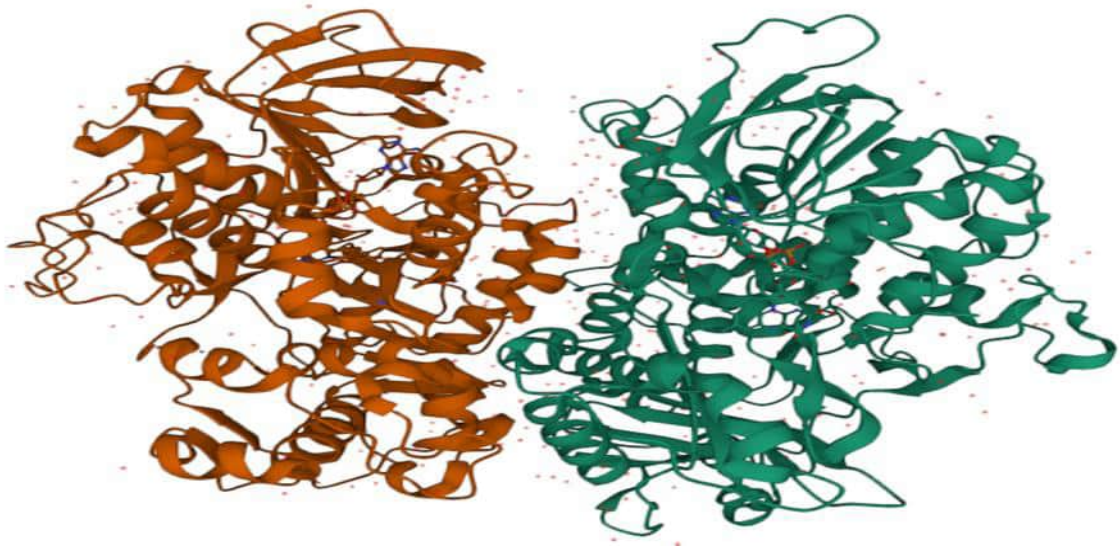


Рисунок 4 – Пространственная структура фермента L-лизин- α -оксидазы [105]

L – лизин связан в пространстве с двумя воронко - подобными структурами, образованными между доменом, связывающим субстрат и спиральным доменом, и лежит на изоаллоксазиновом кольце (ФАД) (Рисунок б).

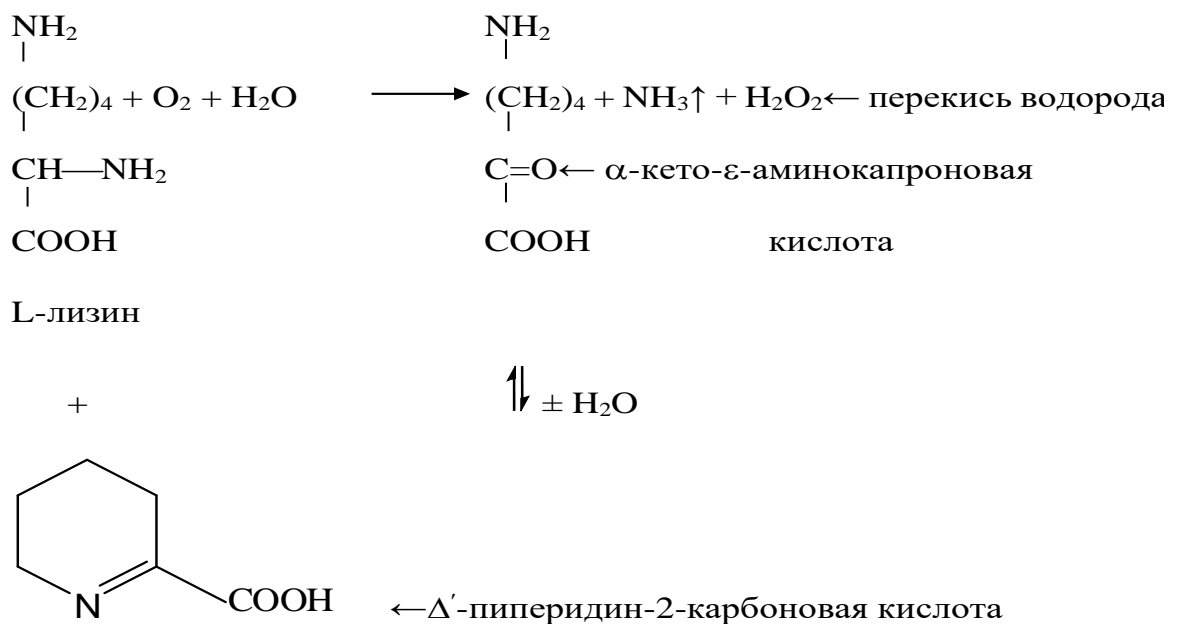


Рисунок 5 – Схема реакции окислительного дезаминирования незаменимой аминокислоты L-лизина в процессе ферментации с участием L-лизин- α -оксидазы [105]

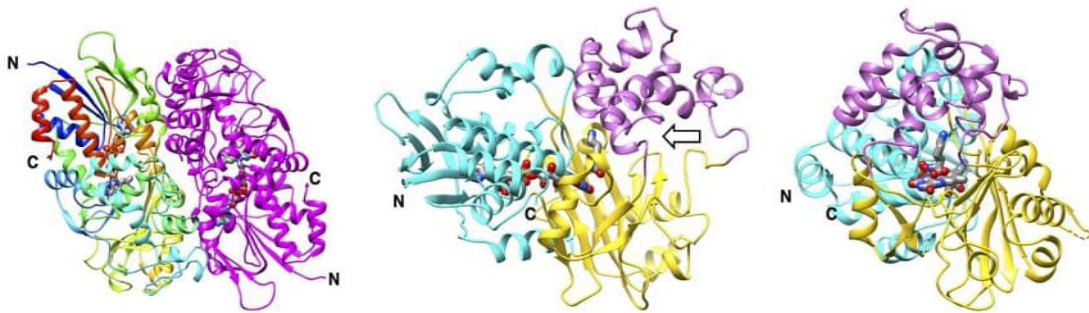


Рисунок 6 – Структура LO (LysOX) в комплексе с L – лизином (LysOX-Lys) [98]

Примечание: Представление цепи димерного белка LysOX-Lys. Одна субъединица окрашена в радужный градиент от N-конца (синий) до C-конца (красный), а другая — в пурпурно-розовый. Ленточная цепь одной субъединицы LysOX-Lys. Структура домена показана разными цветами: голубой — домен, связывающий ФАД; желтый — домен, связывающий субстрат; пурпурный- спиралевидный домен. ФАД и лизин-субстрат показаны в виде палочек, окрашенных по элементам: красный, кислород; синий, азот; серый-карбонная группа. Вход в «воронку» фермента показан стрелкой - вид из воронки. Невидимый сегмент петли 388–391 в данной проекции отмечен желтой пунктирной линией

Аминокислотный остов L – лизина взаимодействует с LysOX LO таким же образом, как и с другими схожими ферментами (Рисунок 6). α -карбоксильная группа L-лизина образует водородные связи с R68 и Y369. Водородные связи α -аминогруппы с карбонильным кислородом A475 и взаимодействие катион- π с индольным кольцом W476 [92, 93].

Фермент L-лизин- α -оксидаза обладает уникальными каталитическими свойствами, которые находят применение в различных областях, включая биомедицинское. Так в 2015 году группой соавторов была описана противоопухолевая активность фермента L-лизин- α -оксидаза [116]. В ходе дальнейших исследований было установлено, что данный фермент демонстрирует ингибирующую активность в отношении пролиферации опухолевых клеток различных гистологических типов. В частности, фермент эффективно подавляет рост плоскоклеточной карциномы легких человека (RERF-LC-AI), опухолевых клеток предстательной железы (PC3), линии опухолевых клеток шейки матки (HeLa), опухоли яичников (SKOV3), опухоли молочной железы (MCF7), опухолей толстой кишки (LS174T и HT – 29) и эритромиелобластозидного лейкоза (K562). При этом не наблюдалось значительного повреждающего воздействия на нормальные эндотелиальные

клетки пупочной вены человека (HUVEC) [113 – 115], а клетки рака молочной железы продемонстрировали повышенную чувствительность к действию фермента по сравнению с другими клеточными линиями [115]. Кроме того, был установлен механизм антипролиферативного действия по отношению к новообразованиям - уменьшение снабжения злокачественных клеток L-лизинном, служащим одной из важных составных частей гистоновых белков, и участие не только в формировании хроматина, но и в тонких механизмах передачи наследственной информации в поколении опухолевых клеток [115].

Было доказано токсическое действие перекиси водорода, выделяемой в ходе реакции, как один из конечных продуктов, на опухолевые клетки. И было доказано повреждение ДНК [115] за счет того, что фермент запускает генерацию H_2O_2 , которая вызывает цитотоксичность и повреждение митохондриальной мембраны [115]. Более того, цитотоксичность зависит от концентрации L-лизина в ткани прямо пропорционально – чем выше концентрация L-лизина в ткани, тем более выражен цитотоксический эффект [115]. LO проявляет высокую противоопухолевую активность за счет более высокого уровня L-лизина в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью [113, 115]. L-лизин — незаменимая аминокислота, присутствующая в тканях организма и плазме крови и играющая важную функциональную роль в обмене веществ, следовательно, лишение L-лизина является важной проблемой, вызванной введением фермента животным.

Фермент L-лизин- α -оксидаза, продуцируемый микроорганизмом *T. harzianum* Rifai, подвергся детальному изучению на обширной панели опухолевых моделей в условиях *in vivo* [98, 99, 113, 115, 155].

Некоторые исследования демонстрируют, что LO проникает в мозг и сохраняет там свое присутствие до 48 часов. При этом LO активно участвует в метаболизме аминокислот в головном мозге. Наиболее существенное влияние LO оказывалось на аминокислоты, непосредственно подвергающиеся его действию (L-лизин, L-орнитин). LO существенно влияет на перераспределение аминокислот, непосредственно связанных с циклом

трикарбоновых кислот (L-аспаргин и L-глутамин) [114]. В исследовании Е. В. Лукашевой было показано, что истощение L-орнитина, предшественника полиаминов, приводит к значительному и долговременному снижению концентрации полиаминов, отвечающих за регуляцию многих процессов, в том числе клеточной пролиферации. Таким образом, LO может быть использован для снижения уровней L-лизин и полиаминов в головном мозге [114].

Несмотря на столь обширное изучение противоопухолевой и ноотропной активности LO, исследований, направленных на изучение противомикробной активности мало. Так в 2014 году И. П. Смирнова и И. В. Раковская исследовали действие LO на микоплазмы [170]. В 2016 году была выявлена противовирусная активность LO по отношению к вирусу клещевого энцефалита человека [169]. Ю. А. Шнейдер и соавторы в 2015 году исследовали ингибирующую активность LO гриба *T. harzianum* Rifai F - 180 по отношению к фитопатогенам [17, 85, 86].

Среди продуцентов LO, помимо вида *T. harzianum*, были выявлены и других представителей рода *Trichoderma*, что было показано в исследовании [100].

Кроме это LO был обнаружен у рыб вида *Scomber Japonicus* [47]. Установлено, что у рыб LO участвует в защитном механизме при предупреждении бактериальной инвазии. Данный факт стал основанием для трансформации гена, кодирующего за синтез LO, в метилотрофные дрожжи вида *P. pastoris*, с последующим анализом функциональной характеристики рекомбинантного фермента L-лизин- α -оксидаза [151].

Ген, выделенный от *Scomber Japonicus*, были также трансформирована *E. coli* с целью одноэтапного синтеза L-пипеколевой кислоты из DL-лизина [13]. В 2015 году группой японских ученых была описана молекулярная характеристика LO, изучена его кристаллическая структура и отсекинирован локус в геноме *T. viride*, ответственный за экспрессию фермента L-лизин- α -оксидаза (Рисунок 7) [13]. Было установлено, что данный ген состоит из 2119

пар нуклеотидов (далее п.н.) и кодирует возможный сигнальный пептид (Met1-Arg77) и зрелый белок (Ala78-Ие617) [13].

Кроме этого, ген содержит большое количество участков, осложняющих процесс лигирования: *BsrDI*, *SapI*, *BspQI*, *BsmI*, *BsiHKAI*, *PspXI*, *MslI*, *Bsp1286I*, *EciI*, *XbaI*, *MscI*, *HindIII*, *KasI*, *NarI*, *KasI*, *BtgZI*, *AflIII*, *NspI*, *BtgI*, *BstAPI*, *Blp*, *Esp3I*, *BsmBI*, *CsiI*, *BglIII*. Также присутствуют участки без возможности лигирования: *BsrBI*, *BciVI*; участок узнавания: *BsrFI*; участки с множественными копиями: *NgoMIV*, *NaeI*, *NarI*, *PluII*; метилированные участки: *BclI*, *Eco57MI*, *PfoI*, *SexAI*, участок с возможностью метилирования-*BsgI*; неионно ингибированный участок: *PciI*, участок, разрушающийся при отрицательных температурах - *BbsI*. *Start* – старт кодон. *End* – стоп кодон.

Таким образом полноразмерная кДНК, кодирующая ген LO - *LysOX*, состоит из 2119 п.н. плюс поли(А), а ожидаемая длина транскрипта состоит из 1845 п.н., кодирующая 615 аминокислотных остатков, аминокислотная последовательность незрелого белка представлена ниже:

```
MDNVDFAESVRTRWARRLIREKVAKELNILTERLGEVPGIPPPREGFRFLGGGYSHDNLPS
DPLYSSIKPALLKEAPRAEEELPPRKVCIVGAGVSGLYIAMILDDLKIPNLTYDIFESSRT
GGRLYTHNFTDAKHDYYDIGAMRYPDIPSMKRTFNLFKRTGMPLIKYYLDGENTPQLY
NNHFFAKGVVDPYMVSVANGGTVPDDVVDVSGEKLQQFGYYKEKLAEDFDKGFDEL
MLVDDMTTREYLKRGGPKGEAPKYDFFAIQWMETQNTGTNLFDAQFSESVIDSFDFDN
PTKPEWYCIEGGTSLLVDAMKETLVHVKVQNNKRVEAISIDLDAPDDGNMSVKIGGKDY
SGYSTVFNTTALGCLDRMDLRGLNLHPTQADAIRCLHYDNSTKVALKFSYPWWIKDCG
ITCGGAASDPLRTRCVYPSYNLGDGTGEAVLLASYTWSQ DATRIGSLVKDAPPQPPKED
ELVELILQNLARLHAENMTYEKIKEAYTGVIYHAYCWAN DPNVGGAFALFGPGQFSNL
YPYLMRPAAGGKFHIVGEASSVHNAWIIGSLESAYTAVYQFLYKYKMWDYLRLLLER
WQYGLQELETGKHGTAHLQFILGSLPKEYQVKI
```

[Источник: NCBI РВ, США]

N-концевая аминокислотная последовательность AEEELPPRKVXIVGAGVSGLY кодируется нуклеотидами 232–294, а внутренние аминокислотные последовательности LQQAFGY, YYLDGENTTQ и GFDELMLVDDMT находятся в позициях 643 - 663, 505 - 534 и 697 - 732 соответственно.

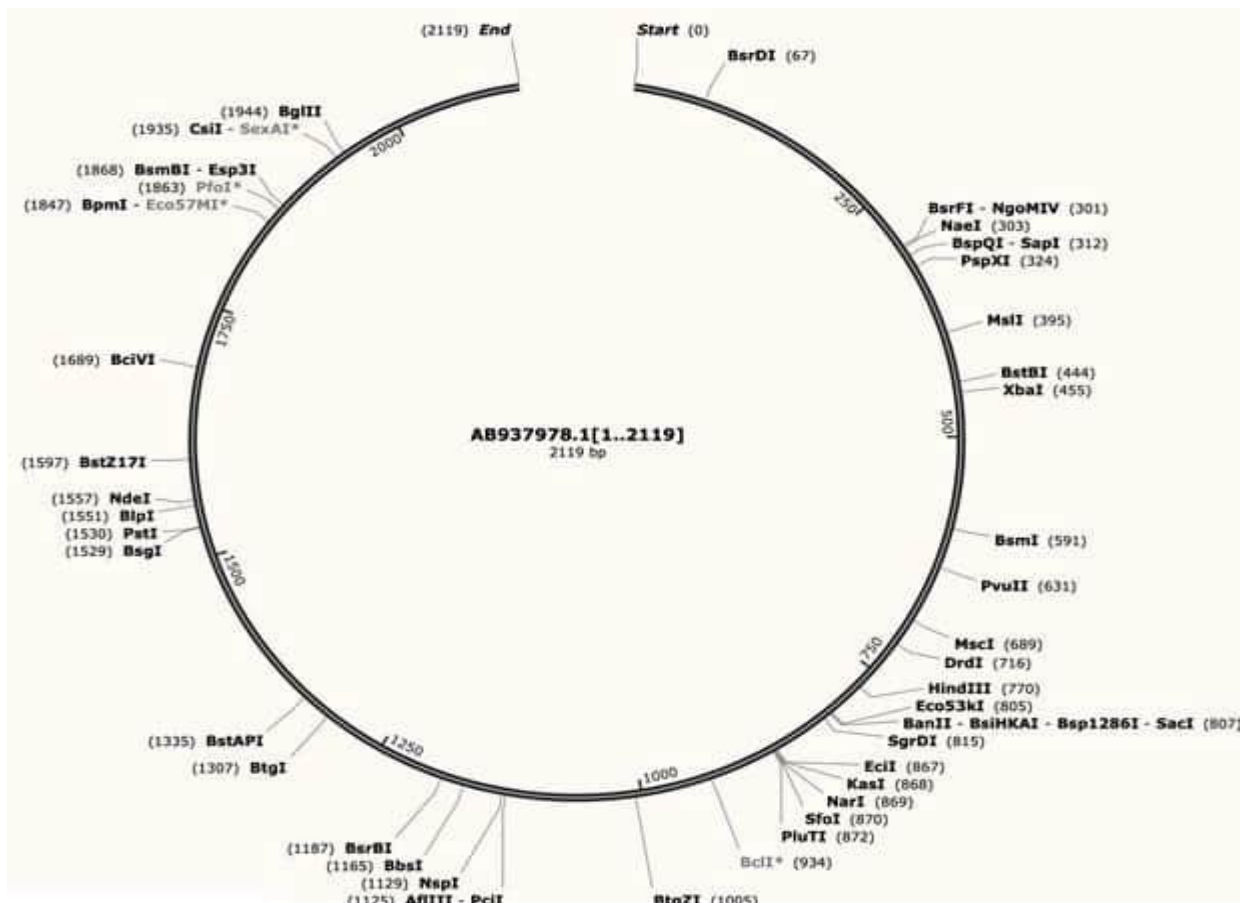


Рисунок 7 – Ген, кодирующий синтез LO (*LysOX*), выделенный из генома плесневого гриба *Trichoderma viride* [13] [Автор: Сенягин А. Н., Программа: SnapGene Viewer (ver. 6.0.2)]

Эти результаты свидетельствуют о том, что *LysOX* синтезируется в качестве предшественника, а N-концевые 77 остатков расщепляются с образованием зрелого белка, состоящего из 541 аминокислотного остатка [13]. Поиски в базе данных NCBI с помощью алгоритма BLAST показали, что *LysOX* из *T. viride* Y244-2 демонстрирует сходство последовательностей с предполагаемыми генами, кодирующими LO *T. simmonsii* на 93%, *T. harzianum* 94%, *Hypocrea pseudokoningii* 63%.

Резюме:

Исследования, посвящённые изучению фермента LO, продуцируемого штаммом *T. harzianum* Rifai F-180, являются важным направлением в решении глобальной проблемы антибиотикорезистентности. Эта проблема ставит под угрозу эффективность традиционных антимикробных препаратов, создавая

необходимость поиска инновационных решений, способных справиться с растущей устойчивостью патогенных микроорганизмов.

Фермент LO заслуживает особого внимания из-за своих уникальных биохимических характеристик. Он катализирует процесс окислительного дезаминирования аминокислоты L-лизина, в результате чего образуются перекись водорода и аммиак — вещества, обладающие антимикробной активностью. Это превращает фермент в эффективный инструмент для разрушения биоплёнок микроорганизмов — ключевого фактора их резистентности. Таким образом, исследование механизма действия фермента открывает новые возможности для разработки антимикробных препаратов, направленных на снижение вирулентности патогенов.

Связь фермента с преодолением антибиотикорезистентности также делает его перспективным для применения в медицине и сельском хозяйстве. LO демонстрирует потенциал для создания экобиотехнологических решений, таких как биопрепараты для защиты растений от фитопатогенов. Более того, его антимикробные свойства можно использовать для разработки препаратов, борющихся с бактериальными и вирусными инфекциями, в том числе в рамках медицинских программ по противоопухолевой терапии.

Реализация этих возможностей актуальна в контексте стратегических приоритетов Российской Федерации. Выполнение задач, предусмотренных распоряжением Правительства Российской Федерации № 2045-р от 25 сентября 2017 года «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», требует научной базы, направленной на разработку новых антимикробных препаратов. Исследования LO закладывают фундамент для преодоления вызовов, связанных с резистентностью, и способствуют развитию отечественной биотехнологии, микробиологии и медицинской науки.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. ДИЗАЙН ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовательская часть диссертационной работы была выполнена в четыре этапа. Для каждого этапа был разработан и визуализирован дизайн эксперимента.

Первый этап работ был направлен на подбор оптимальных условий культивирования продуцента *T. harzianum* Rifai F-180 в лаборатории и сепарация фракции культуральной жидкости (КЖ), содержащей LO – концентрата культуральной жидкости (кКЖ). При каждом пассаже осуществлялся контроль стерильности среды. Важным критерием подбора условий культивирования продуцента было наличие максимальной активности фермента в КЖ. Наличие фермента в КЖ определялось с помощью денатурирующего электрофореза. Также на этом этапе была произведена фракционная очистка наработанной КЖ продуцента *T. harzianum* Rifai F-180 с целью получения фракции, содержащей LO, который был использован в дальнейших экспериментах (Рисунок 8).

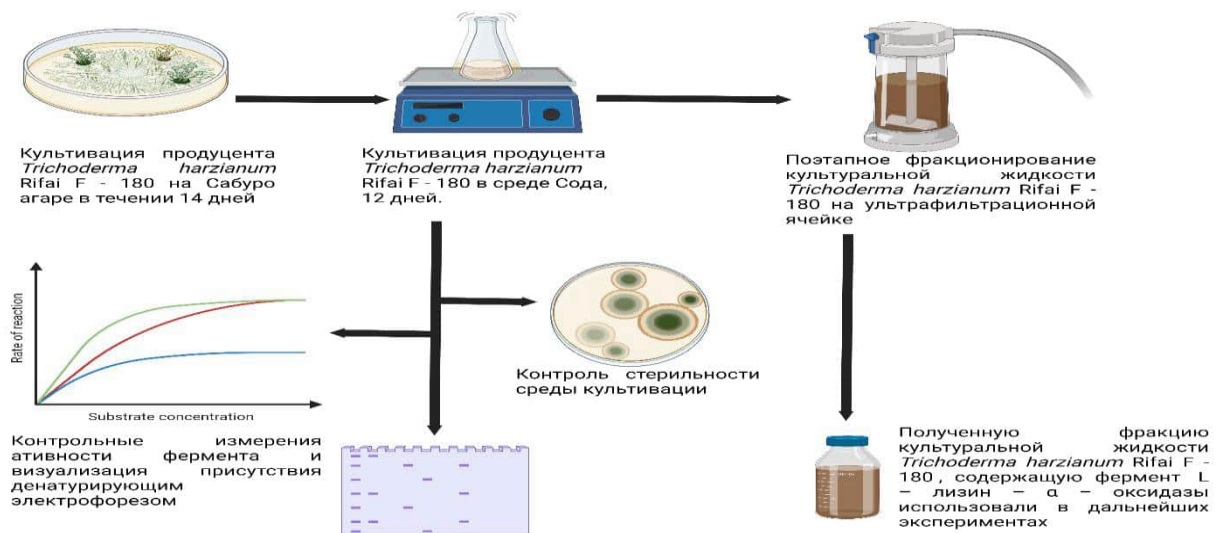


Рисунок 8 – Первый этап исследования (*in vitro*) – лабораторное культивирование продуцента *T. harzianum* Rifai – 180 для получения LO и кКЖ, содержащей LO (BioRender.com / Created with BioRender.com)

На втором этапе работ было проведено культивирование исследуемых микроорганизмов в соответствующих для вида условиях. Далее был определен профиль антибиотикорезистентности для каждого штамма с помощью диско-

диффузионного метода Кирби-Бауэра. После были получены данные об антагонистическом действии LO и кКЖ в отношении исследуемых микроорганизмов. Также на данном этапе была определена способность исследуемых штаммов микроорганизмов образовывать биопленки и наличие ингибирующего действия LO и кКЖ на биопленкообразование на Конго-красном агаре и с помощью микропланшетного метода. Ингибирование биопленкообразования было подтверждено с помощью СЭМ мембран с биопленками, предварительно обработанными LO и кКЖ (Рисунок 9).

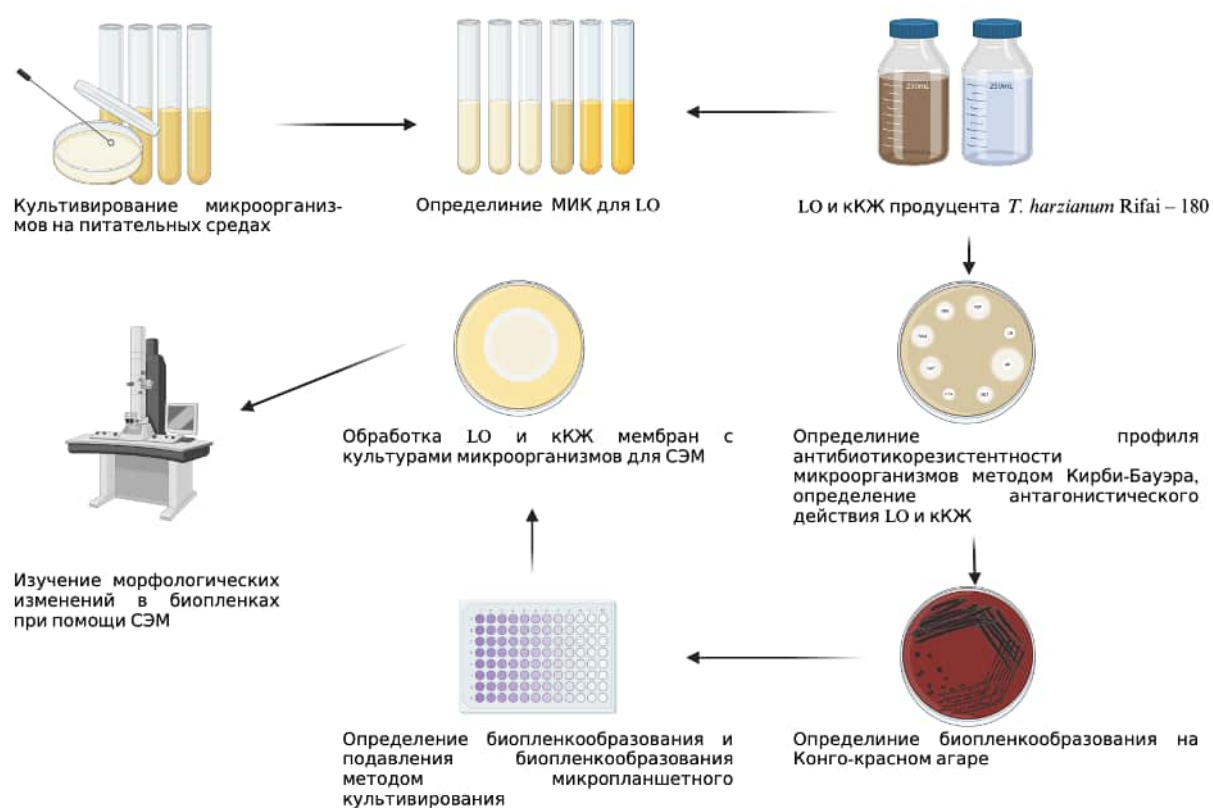


Рисунок 9 – Второй этап исследования (*in vitro*) – изучение антагонистических свойств LO и кКЖ, содержащей LO (BioRender.com / Created with BioRender.com)

На третьем и четвертом этапах работы в условиях *in vivo* были определены цитотоксические, иммунологические свойства LO. Цитотоксичность LO оценивали на клеточной линии Vero E6 путем оценки жизнеспособности клеток после их обработки LO. Иммунологические свойства изучали на животных моделях млекопитающих. Кроликов гипериммунизировали с последующим отбором крови, получением сыворотки

и постановкой серологических реакций с целью определения наличия антител к LO. На морских свинках после их иммунизации были поставлены опыты выявления анафилактической реакции и кожной аллергической пробы в отношении LO. Также была произведена пятикратная иммунизация крыс с последующим получением от них сыворотки с целью определения титра антител к LO методом иммуноферментного анализа (Рисунок 10, 11).

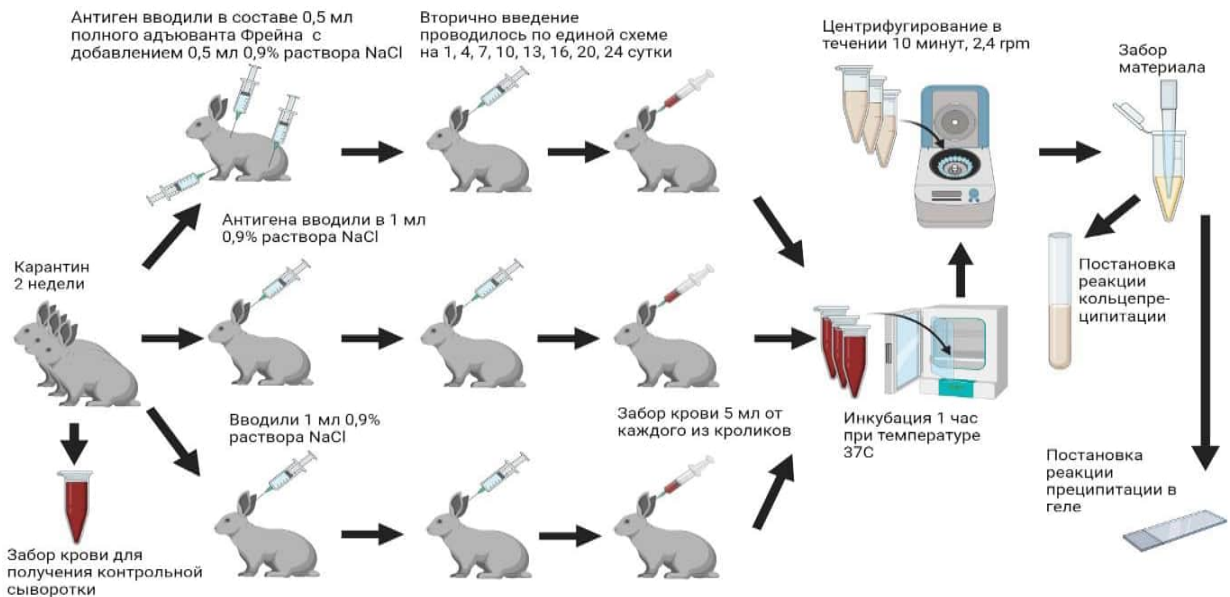


Рисунок 10 – Изучение иммунологических свойств LO на биологических моделях (кролик) путем гипериммунизации (BioRender.com / Created with BioRender.com)

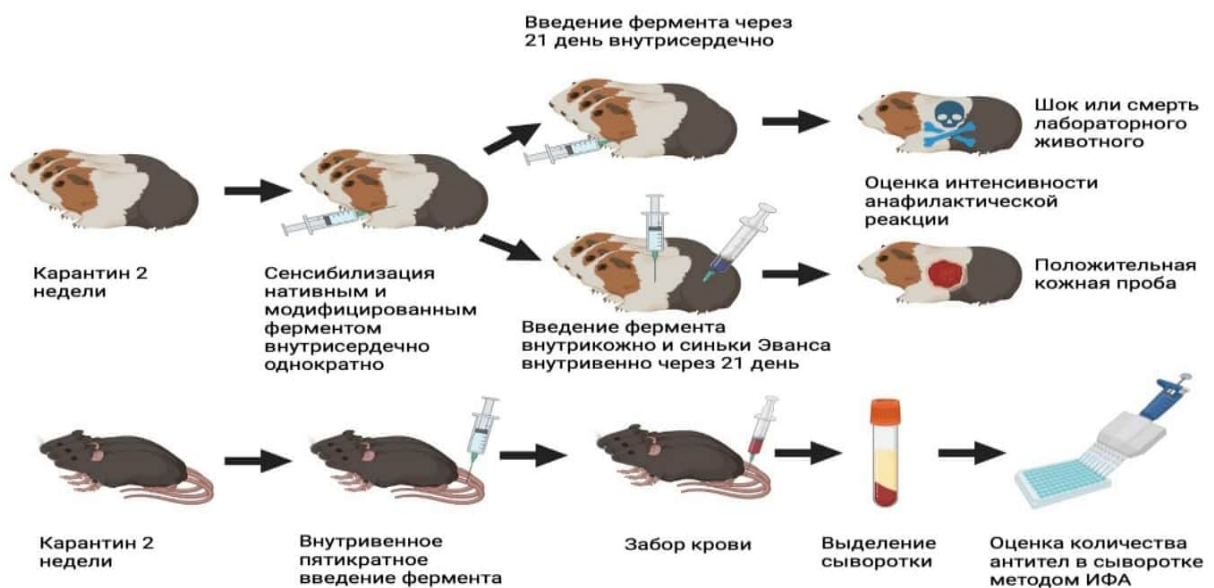


Рисунок 11 – Изучение иммунологических свойств LO на мышах и морских свинок: изучение анафилактической реакции, кожной аллергической пробы и определение титра антител к LO (BioRender.com / Created with BioRender.com)

ГЛАВА 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТА *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI F – 180 И ВЫДЕЛЕНИЕ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Макроскопическими характеристиками культивируемого продуцента – *T. harzianum* Rifai F–180 является наличие воздушного мицелия белого цвета, который при спорообразовании окрашивается в тёмно-зелёный цвет. Для работы отбирали культуру с равномерным ростом мицелия, без пятен и разрывов. При микрокопировании наблюдали гифы гриба с характерным для продуцента типом спороношения - хламидоспорами.

Наблюдалось полное соответствие посевной культуры указанным требованиям: при микроскопии хорошо определяется развитый мицелий продуцента, спорообразования хламидоспор не определяется, что соответствует стадии вегетативного роста продуцента. Окраска культуральной жидкости в колбах – начало появления коричневого цвета. Культура продуцента полностью соответствовала необходимым требованиям для инокуляции.

Как видно из представленных в таблице 3, данных, ни на одном из этапов культивирования продуцента в целях получения КЖ, контаминации среды не выявлялось.

Таблица 3 – Контроль стерильности культуры продуцента *T. harzianum* Rifai F – 180 на этапах лабораторного культивирования

Этап	Среда	Результат
1. Выращивание продуцента на Сабуро – агаре (в течение 14 дней)	МПБ	Контаминация культуры отсутствует
	МПА	Контаминация культуры отсутствует
	СА	Контаминация культуры отсутствует

Продолжение таблицы 3

2. Выращивание культуры на среде Сода (Общие данные за все дни культивирования, включая забор до посева)	МПБ	Контаминация культуры отсутствует
	МПА	Контаминация культуры отсутствует
	СА	Контаминация культуры отсутствует
3. Этап очистки	МПБ	Контаминация культуры отсутствует
	МПА	Контаминация культуры отсутствует
	СА	Контаминация культуры отсутствует

Для каждого из используемых методов определения белка в растворе была построена калибровочная кривая по СБА (сывороточный бычий альбумин) с известной концентрацией белка в стоковом растворе, проведены замеры и построена усредненная калибровочная кривая для используемых методов. На протяжении двенадцати дней культивирования продуцента *T. harzianum* Rifai F-180 проводился забор среды культивирования по 1 мл с последующим определением концентрации общего белка в растворе, изначальную концентрацию общего белка среды приняли за ноль, для удобства расчетов, результаты представлены на рисунке 12. Для определения концентрации общего белка в КЖ на протяжении 12 дней ферментации использовали методы Лоури, Брэдфорда и спектрофотометрию. На рисунке 12 также представлена средняя калибровочная кривая по используемым методам. Как видно из рисунка 12, наиболее чувствительным является метод Лоури.

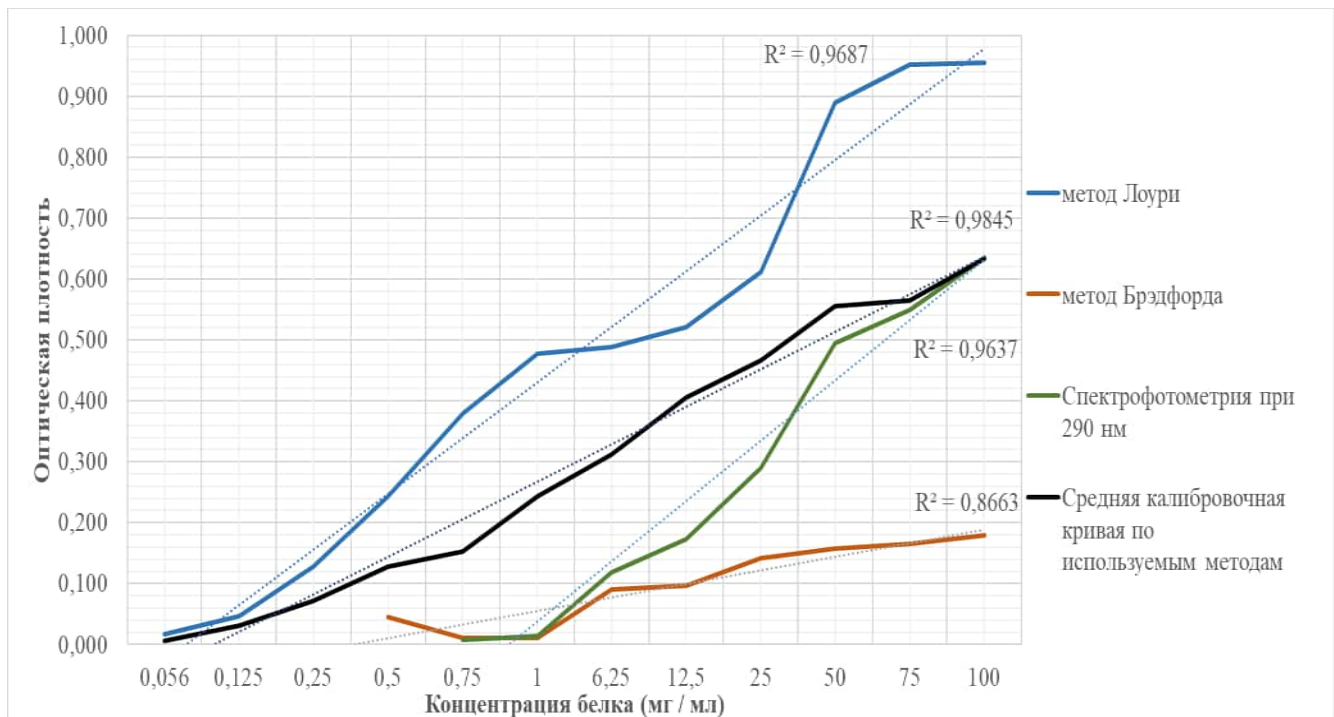


Рисунок 12 – Сводный график увеличения концентрации общего белка в среде культивирования продуцента *T. harzianum* Rifai F–180

При электрофорезе кКЖ *T. harzianum* Rifai F–180 в ПААГ было установлено, что LO содержится в кКЖ и соответствует известным молекулярным характеристикам (Мол. масса= 114–116 кДа) в сравнении с гомогенным ферментом LO (hLO) используемым в качестве контроля и маркером молекулярной массы (ММ). Контрольными днями определения LO в растворе были выбраны 3-й, 6-й и 9-й день культивирования (Рисунок 13). На 12-й проводилась ультрафильтрация КЖ, с соединением культуральной жидкости 4-х колб в единый объем, и последующем проведением электрофореза в ПААГ (Рисунок 14). После ультрафильтрации также проводился электрофорез (Рисунок 15).

На 3-и сутки ферментации продуцента *T. harzianum* Rifai F–180 с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ КЖ определялись фракции белок с молекулярной массой в диапазоне от 0 до 26кДа (Рисунок 13А). На 6-е сутки культивирования продуцента *T. harzianum* Rifai F–180 с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ КЖ определялись фракции белок с молекулярной массой в диапазоне от 0 до 19 кДа (Рисунок 13В). На 9-е сутки культивирования продуцента *T. harzianum* Rifai F–180 с

помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ КЖ определялись фракции белок с молекулярной массой в диапазоне от 50 до 90 кДа (Рисунок 13С).

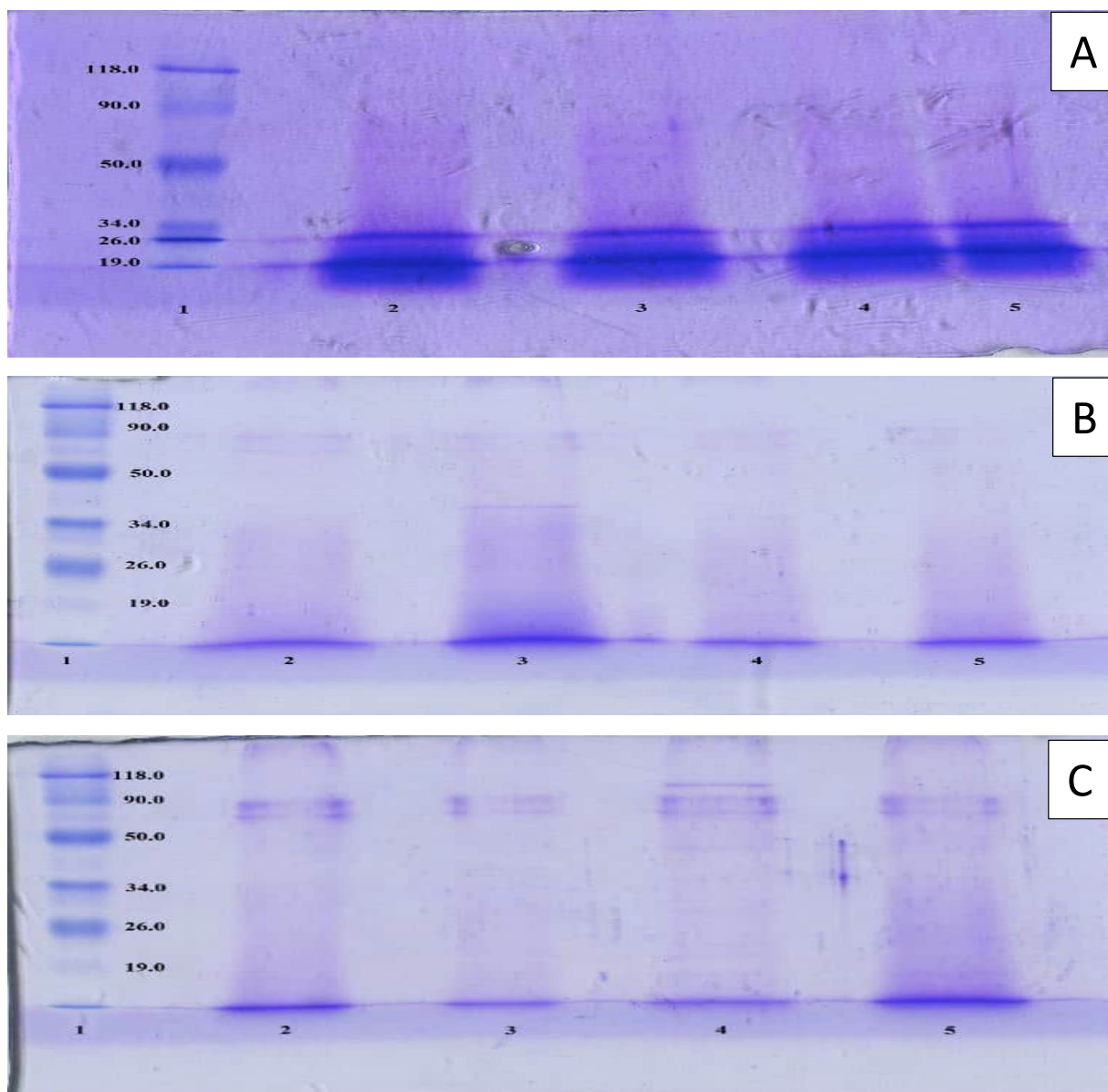


Рисунок 13 – Денатурирующий электрофорез в ПААГ КЖ на 3-ие, 6-ые и 9-ые сутки культивирования *T. harzianum* Rifai F-180 (А – 3-ие сутки культивирования, В – 6-ые сутки культивирования, С – 9-ые сутки культивирования)

Примечание: 1 – контроль молекулярных масс; 2 - КЖ из 1-ой колбы 5 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V=10 мкл.; 3 – КЖ из 2-ой колбы 5 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V=10 мкл.; 4 – КЖ из 3-ой колбы 5 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V=10 мкл.; 5 - КЖ из 4-ой колбы 5 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V=10 мкл

Активность LO в КЖ на данном этапе определяли в диапазоне значений:

3-ие сутки культивирования *T. harzianum* Rifai F-180 – 0,05- 0,09 Ед/мг, 6-ые

сутки культивирования – 0,17 – 0,18 Ед/мг, 9-ые сутки культивирования – 0,21 – 0,24 Ед/мг.



Рисунок 14 – Предфильтрационный электрофорез в ПААГ КЖ *T. harzianum* Rifai F-180

Примечание: 1 – hLO (контроль положительный) 5 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V = 10 мкл; 2 - КЖ 15 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V=20 мкл; 3 – контроль молекулярных масс

Активность LO в КЖ на данном этапе определяли в диапазоне значений 0,54 – 0,58 Ед/мг.



Рисунок 15 – Электрофорез в ПААГ КЖ, полученной путем ультрафильтрации, после всех этапов лабораторной очистки

Примечание: 1 – LO (контроль положительный) 5 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V = 10 мкл; 2 - LO (контроль положительный) 15 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V = 20 мкл; 3 – контроль молекулярных масс; 4 – концентрат КЖ 15 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V = 20 мкл; 5 - концентрат КЖ 5 мкл + раствор для аликвоты 5 мкл, V = 10 мкл

Активность LO в КЖ на конечном этапе определяли в диапазоне значений 2,86 – 2,88 Ед/мг.

По результатам данного этапа были подобраны условия культивирования продуцента *T. harzianum* Rifai F-180 для продукции фермента L-лизин- α -оксидазы: температура $+27,0 \pm 1,0$ °C; - pH – 6,7- 7,1; в атмосфере воздуха, при смешанной культивировании, с постоянным перемешиванием среды 80 – 120 rpm / min; продолжительность культивирования - от 5 до 12 дней, максимальная активность фермента определялась на 11 – 12 сутки ферментации.

ГЛАВА 4. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ РЕАКЦИИ

Модифицированный метод определения активности LO на фотоэлектроколориметре был разработан с целью сокращения временных затрат на определение активности фермента и исключения воздействия канцерогенных веществ на оператора. Было подобрано соотношение компонентов реакционной среды на 1 мл с использованием кювет 5,075 при длине волны 450 нм и время инкубации 10 минут. Метод был адаптирован под микропланшетное определение.

Совместно с профессором ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России В. Ф. Ларичевым и профессором кафедры биохимии им. Т. Т. Березова РУДН им. Патриса Лумумбы И. П. Смирновой, был модифицирован метод определения активности LO. На первом этапе в реакционную смесь вносили LO и L-лизина для ферментативной реакции. На следующем этапе отбирали небольшое количество реакционной смеси (LO + L-лизин) и добавляли необходимое количество цитратно-фосфатного буфера, ТМБ. Расчеты по количеству реактивов описаны ниже. Образующая в результате окислительного дезаминирования L-лизина, перекись водорода вступает во взаимодействие с тетраметилбензидина (ТМБ). ТМБ окисляется под воздействием перекиси водорода, меняет цвет реакционной смеси и образует субстрат-индикаторный комплекс, который поддается оптической детекции как визуально, так и с помощью спектрофотометра. При подборе оптимальных условий реакции использовались стеклянные пробирки объемом 15 мл (ЭкоЛаб, Россия) для минимизации ошибки оператора при работе с микрообъемами. После определения идеальных условий протекания реакции опыт масштабировали и дальнейшие измерения активности фермента проводили в 96-ти луночных планшетах (NEXT, КНР) по следующей схеме. В каждую лунку планшета добавляли смесь ТМБ и буфера (хромогенная смесь) в общем объеме 100 мкл. Далее добавляли смесь LO и L-лизина в общем

объеме 50 мкл. После появления синего окрашивания реакцию останавливали добавлением 1Н H_2SO_4 в объеме 100 мкл. Степень интенсивности изменения окрашивания определяли на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Чем выше активность фермента и его количество в реакционной смеси, тем больше образуется перекиси водорода в результате окислительного дезаминирования L-лизина. Чем выше концентрация перекиси водорода, тем интенсивнее протекает окисление ТМБ, что в свою очередь ведет к более насыщенному синему окрашиванию реакционной смеси.

Для стандартизации метода необходимо было определить оптимальные значения рН для проявления изменения окрашивания реакционной смеси. При использовании цитратно-фосфатного буфера (ЦФБ) в сочетании с реакционной смесью измерение интенсивности окрашивания проводилось в диапазоне рН от 3,0 до 9,0. Калибровочная кривая для стандартизации результатов определения активности фермента по получаемому продукту, перекиси водорода, была построена с применением стандартного раствора H_2O_2 с известной начальной концентрацией раствора (Panreac, Испания). Влияние температуры на активность фермента LO исследовалось в интервале 25°C – 45°C . Определение активности LO проводили на планшетном спектрофотометре (BioTek uQuant X200, Россия), при длине волны 450 нм.

Для определения референтных значений рН, при которых LO является максимально активным, а степень окрашивания реакционной смеси наиболее интенсивной в присутствии ТМБ использовали ЦФБ. Результаты исследования представлены на рисунке 16.

Как видно из рисунка 16 при рН равной 3,0 и 4,0 ОП цветной реакции значительно ниже, чем при рН равной 5,0. При дальнейшем повышении рН до 9,0 наблюдается резкое снижение ОП. Оптимальный рН ЦФБ для хромогенной смеси - 5,0.

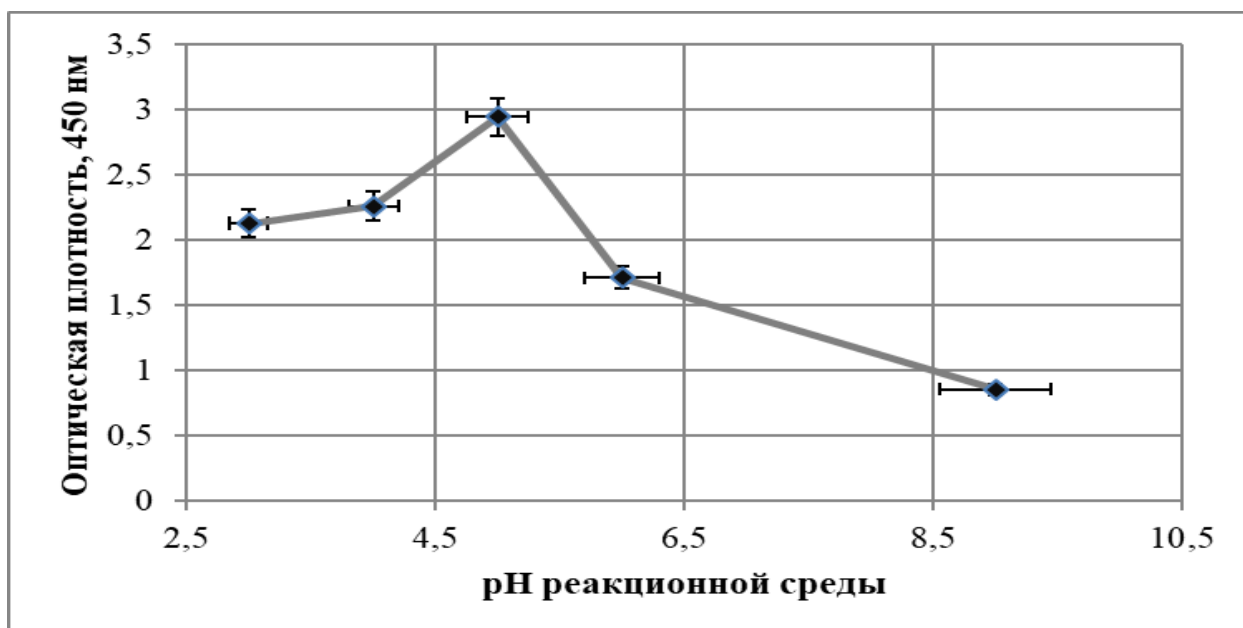


Рисунок 16 – Влияние pH цитратно-фосфатного буфера хромогенной смеси на интенсивность цветной реакции

Следующей целью стандартизации метода было обнаружение зависимости между степенью интенсивности окрашивания и концентрацией КЖ в реакционной смеси. Для изменения концентрации КЖ в реакционной смеси использовался метод серийных разведений с шагом, равным двум, в фосфатном буфере с pH 5,0. Результаты исследования представлены на рисунке 17.

Как видно из рисунка 17 проявление ферментативной активности становится явным при наибольшем разведении, и дальнейшее уменьшение разведения (увеличение объема КЖ) сопровождалось увеличением интенсивности окраски реакционной смеси.

Для стандартизации результатов определения активности фермента по получаемому продукту, перекиси водорода, была построена калибровочная кривая с применением стандартного раствора H_2O_2 с известной начальной концентрацией раствора, равной 33%, и дальнейшим титрованием с шагом два (Рисунок 18).

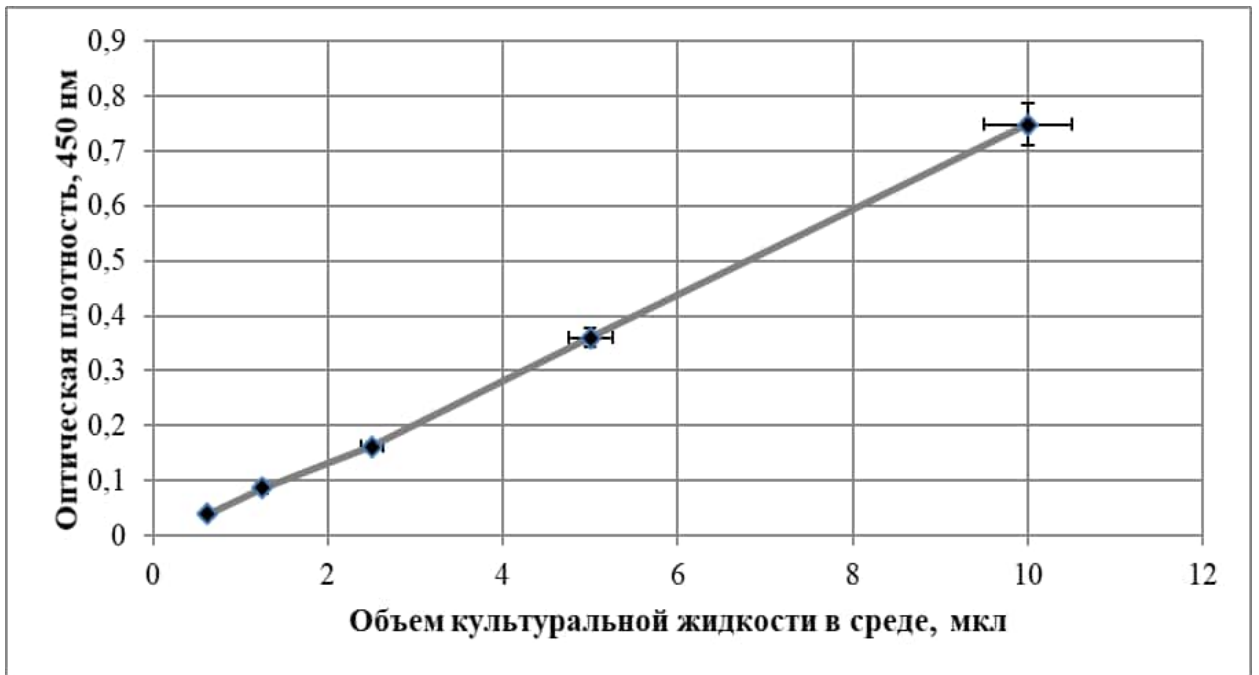


Рисунок 17 – Влияние объема КЖ продуцента на оптическую плотность реакционной смеси

Как показано на рисунке 18 двукратное увеличение количества перекиси водорода приводит к двукратному росту оптической плотности, также прослеживается линейная зависимость.

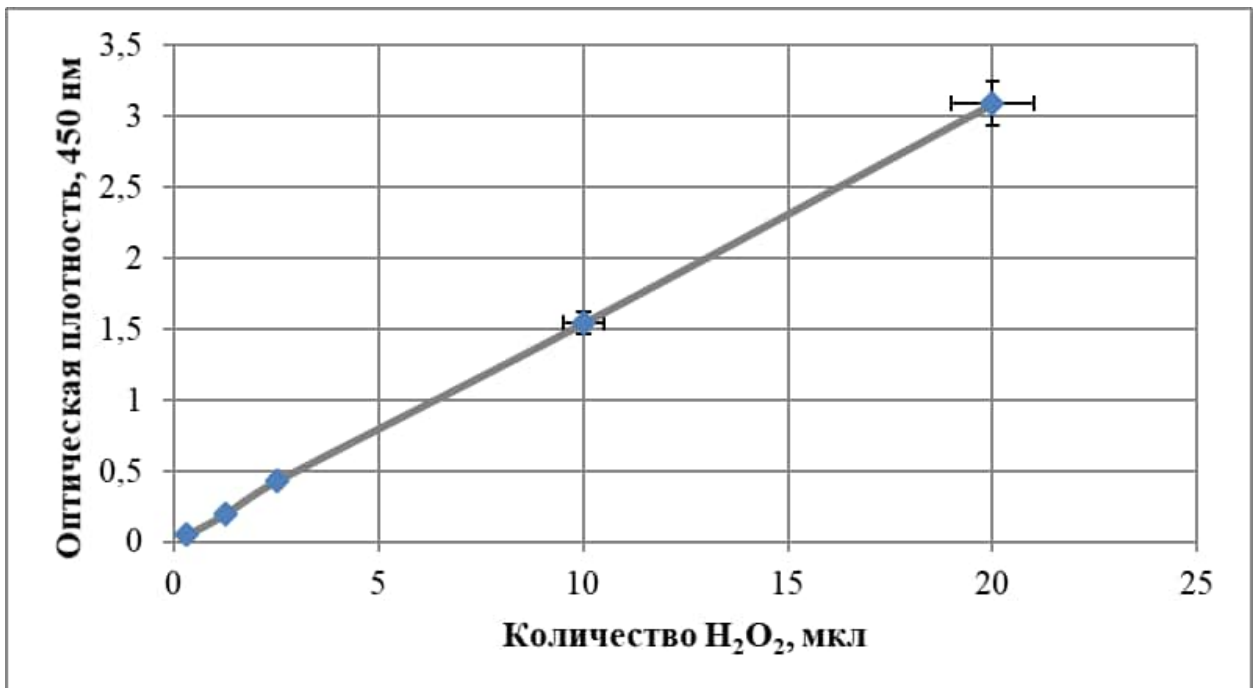


Рисунок 18 – Изменение оптической плотности хромогенной среды в зависимости от количества H_2O_2

Известно, что ТМБ является индикаторным реактивом в ИФА для определения пероксидазы хрена (ПХ). Поэтому для стандартизации реакции

было проведено исследование, где в качестве субстрата для ТМБ выступала не перекись водорода, а ПХ. По результатам этого этапа была построена калибровочная кривая, иллюстрирующая степень интенсивности окрашивания реакционной смеси в зависимости от концентрации ПХ (Рисунок 19).

Рисунок 19 демонстрирует, что, начиная с определенной концентрации (0,15 мкл) ПХ в реакционной смеси, оптическая плотность выходит на плато и в дальнейшем сильно не изменяется.

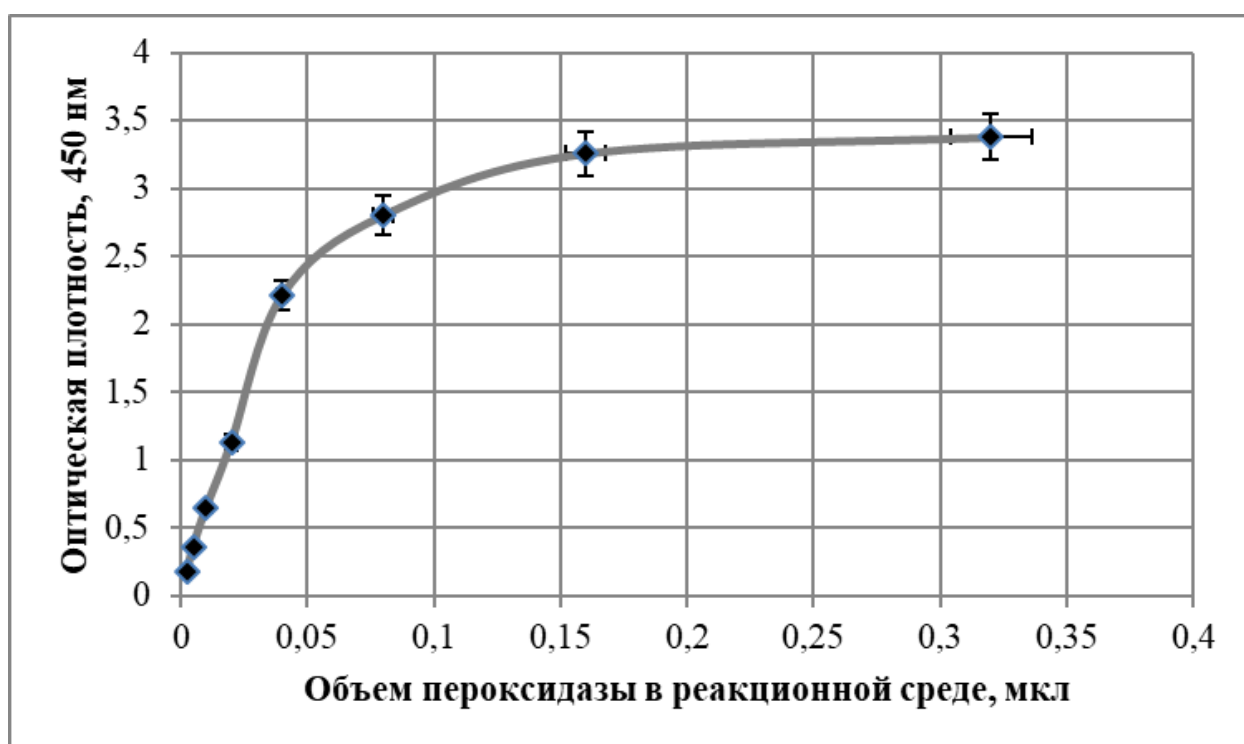


Рисунок 19 – Влияние объема пероксидазы хрена в реакционной смеси на оптическую плотность

В результате эксперимента было показано, что оптимальное количество ПХ составляло 0,05 мкг в мл.

В последующих экспериментах исследовали влияние температуры реакционной смеси на активность фермента ЛО в отношении L-лизина в интервале температур от 22 °С до 45 °С с шагом в три градуса. Рисунок 20 иллюстрирует, что наибольшее количество H_2O_2 образовывалось при температуре 37 °С.

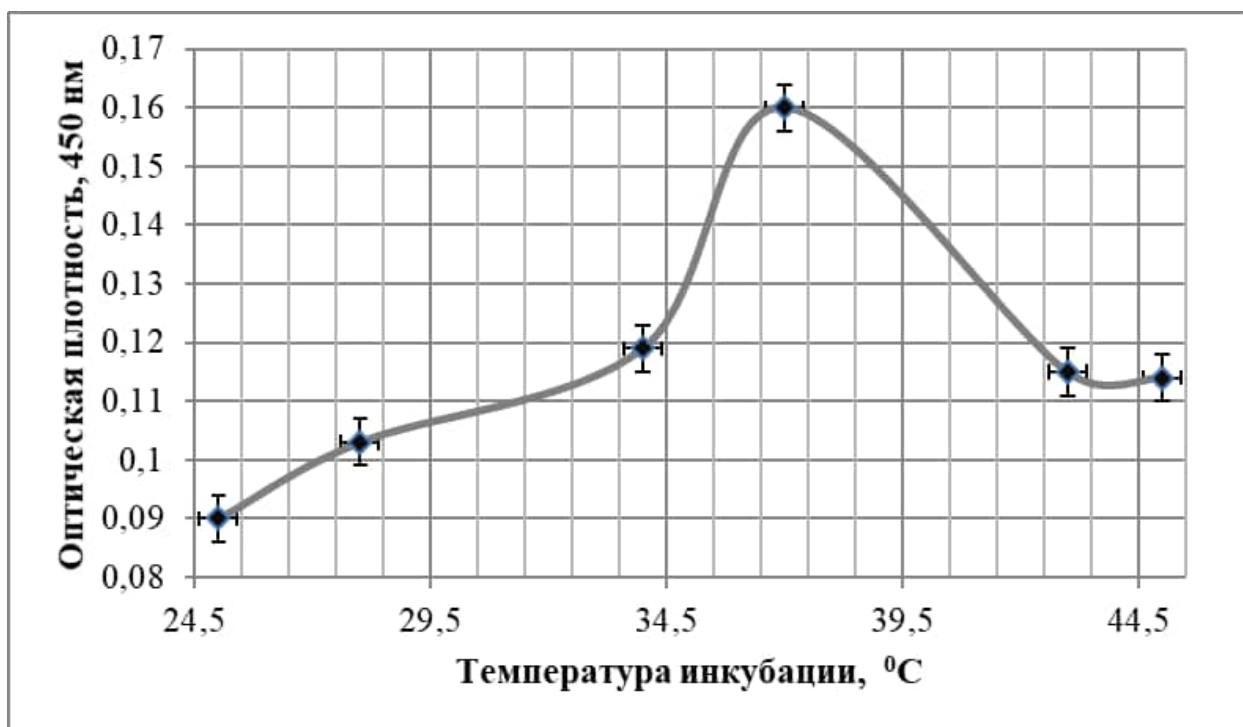


Рисунок 20 – График изменения оптической плотности реакционной среды в зависимости от температуры инкубации реакционной среды

В итоге было проведено сравнительное исследование методов с использованием ОДГ и ТМБ при 492 нм и при 450 нм (Таблица 4). Определение проводили с пробой №1 и пробой №2.

Таблица 4 – Оптическая плотность цветной реакции при использовании индикаторного раствора на основе ОДГ и оптическая плотность цветной реакции при использовании индикаторного раствора на основе ТМБ

Определение количества H_2O_2 при помощи О-дианизин-гидрохлорид (ОДГ) при длине волны 492 нм		Определение количества H_2O_2 при помощи тетраметилбензида (ТМБ) при длине волны 450 нм		Разведение 33% р-ра H_2O_2
Проба №1	Проба №2	Проба №1	Проба №2	
3,023	3,748	*****	*****	1/20 000
2,051	2,293	3,939	*****	1/40 000
0,954	1,223	1,901	3,049	1/80 000
0,621	0,690	1,282	1,313	1/160 000
0,238	0,241	0,730	0,763	1/320 000
0,101	0,097	0,426	0,412	1/640 000
0,058	0,068	0,249	0,240	1/1 280 000

Продолжение таблицы 4

0,055	0,049	0,074	0,080	Контроль, буфер
0,067	0,071	0,078	0,083	

Как видно из таблицы 4, при сравнении реакций с ОДГ и ТМБ, показания оптической плотности значительно выше при использовании ХС с ТМБ, что свидетельствует о том, что данный метод является более чувствителен.

Применение планшетного варианта метода позволяет масштабировать эксперименты. Новый метод обеспечивает повышение точности определения фермента в 10 раз, обладает повышенной чувствительностью и обеспечивает возможность определения активности LO у штаммов-продуцентов не только с выраженной активностью LO, но и у тех, где эта активность ранее не определялась.

На основании приведённых исследований предложен состав хромогенной смеси для проведения анализа активности LO в КЖ потенциальных продуцентов данного фермента. Состав представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Состав хромогенной смеси для определения активности фермента LO

Состав реакционной смеси:	Опыт	K1* ¹	K2* ²
1. L-лизин	0,1 мл	-	+
2. Хромогенная смесь	0,05 мл	+	+
3. Культуральная жидкость	0,1 мл	+	+
4. Пероксидаза хрена	0,05 мл	+	-
5. Цитратно-фосфатный буфер pH 5,0	0,7 мл	+(0,8 мл)	+

Примечание: *¹ – на наличие L-лизина., *² – на наличие H₂O₂

Для расширения возможности исследования фермента и потенциальных продуцентов нами была адаптирована методика для определения активности LO на спектрофотометре (СФ-2000, Россия), в связи с его большей доступностью и простотой в использовании. Это позволит значительно расширить возможность применения в практике разработанной хромогенной

смеси. Измененный в объемах состав реакционной смеси представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Состав хромогенной смеси, адаптированный под определение активности на спектрофотометре

Состав реакционной смеси:	Опыт	K1* ¹	K2* ²
1. L-лизин	0,2 мл	-	+
2. Хромогенная смесь	0,1 мл	+	+
3. Культуральная жидкость	0,2 мл	+	+
4. Пероксидаза хрена	0,1 мл	+	-
5. Цитратно-фосфатный буфер pH 5,0	1,4 мл	1,6 мл	+

Примечание: *¹ – на наличие L-лизина., *² – на наличие H₂O₂

В связи с изменением условий определения (другой прибор), а именно: объёмов компонентов реакционной среды был проведен ряд исследований для определения оптимальных условий, но существенных отличий, которые могут повлиять на результат обнаружено не было. Соответственно условия идентичны ранее изложенным.

По результатам данного этапа исследования был разработан новый более чувствительный метод определения активности фермента на основе ТМБ. Также были установлены оптимальные условия для определения активности LO (pH - 5,0, температура - 37 °C) и состав реакционной смеси (L-лизин-0,1 мл, хромогенная смесь-0,05 мл, культуральная жидкость-0,1 мл, пероксидаза хрена - 0,05 мл, цитратно-фосфатный буфер pH 5,0- 0,7 мл).

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ

5. 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОГРАММЫ

Исследование чувствительности к антибиотикам тестируемых микроорганизмов проводили с помощью диско-диффузионного метода Кирби-Бауэра.

Для каждого выбранного микроорганизма определяли антибиотикограмму (Таблица 7) и рассчитывали индекс множественной лекарственной резистентности (ИМЛР).

Таблица 7 – Спектр антибиотикорезистентности выбранных микроорганизмов (мм \pm m)

Микроорганизм	NIT	TE	CTR	AMC	FO	CAZ	IPM	CAC	CIP	AMP	TR
<i>E. coli</i> M17	25.4 \pm 1.5 6	25.4 \pm 1.5 1	26.8 \pm 1.3	25.8 \pm 1.4 8	25.2 \pm 2.8 4	25.8 \pm 1.4 8	25.8 \pm 2.4 8	24.8 \pm 0.8 3	30.4 \pm 2.8 8	25.8 \pm 0.8 3	21.2 \pm 1.3
<i>K. pneumoniae</i> 1449	23.8 \pm 1.9	22.2 \pm 1.3	24.8 \pm 1.3	21.8 \pm 0.8 3	28.8 \pm 0.8 3	21.8 \pm 0.8 3	24.0 \pm 1.8	12.8 \pm 0.8 3	22.4 \pm 1.1 4	0	20.8 \pm 0.8 3
<i>K. oxytoca</i> 3003	19.0 \pm 0.6 3	0	21.0 \pm 0.7 8	26.5 \pm 0.8 2	20.0 \pm 0.7 8	12.5 \pm 0.5 4	27.0 \pm 1.2	10.0 \pm 1.2 7	29.0 \pm 0.8 3	0	0
<i>A. xylosoxidans</i> 4892	0	0	24.6 \pm 1.1 4	24.0 \pm 1.5 8	0	15.8 \pm 1.0	24.4 \pm 1.5 1	13.6 \pm 1.8 1	25.8 \pm 1.7 8	22.2 \pm 1.3	0
<i>A. baumannii</i> 5841	21.2 \pm 1.3	25.0 \pm 1.0	26.6 \pm 1.5	24.6 \pm 1.1 4	30.4 \pm 1.1 4	24.0 \pm 0.7	23.4 \pm 1.1 4	21.4 \pm 1.6 7	26.6 \pm 1.6 7	21.6 \pm 2.7	14.4 \pm 1.4
<i>C. freundii</i> 426	23.8 \pm 1.3	21.2 \pm 0.8 3	23.2 \pm 1.4 8	21.8 \pm 0.8 3	24.4 \pm 1.1 4	0	22.2 \pm 1.3	0	27.2 \pm 1.6 4	0	22.8 \pm 1.4 8

Продолжение таблица 7

<i>M. catarrhalis</i> 4222	6.0± 0.74	21.0 ±0.7 5	24.5 ±0.9 8	21.5 ±0.8 1	24.5 ±0.5 4	8.0± 0.75	20.0 ±0.8 9	18.0 ±0.7 5	22.5 ±1.0 4	0	12.0 ±1.3 9
<i>M. morgani</i> 1543	10.0 ±0.5 1	0	19.0 ±0.8 9	25.0 ±1.5 1	31.0 ±0.8 4	21.0 ±0.9 5	27.0 ±1.1	20.5 ±1.2 1	18.0 ±0.5 4	0	0
<i>P. mirabilis</i> 1543	31.0 ±1.4 7	0	20.0 ±1.0 3	28.0 ±0.7 5	22.0 ±0.5 1	24.0 ±0.5 4	28.0 ±0.7 5	19.0 ±1.3 6	29.0 ±0.5 4	8.0± 1.06	0
<i>P.aeruginosa</i> 3057	0	0	25.0 ±0.4 1	32.0 ±1.5 2	28.0 ±0.5 4	12.0 ±0.4 1	25.0 ±1.3 7	23.0 ±1.2 1	34.0 ±1.4 7	0	0
<i>S. marcescens</i> 6441	0	21.8 ±0.8 3	24.6 ±1.1 4	23.2 ±2.4	30.9 ±2.2 3	25.9 ±1.5 8	23.7 ±0.8 3	20.9 ±1.5 8	24.2 ±0.8 3	0	24.8 ±1.4
<i>S. aureus</i> 4785	13.0 ±0.8 4	26.0 ±1.5 1	21.0 ±0.8 1	27.0 ±0.4 1	29.0 ±0.5 4	0	24.0 ±0.5 1	0	20.0 ±0.4 1	0	0
<i>S. simulans</i> 5882	21.0 ±0.8 1	19.0 ±1.6	23.0 ±0.4 1	30.0 ±0.8 3	28.0 ±0.8 9	8.0± 0.9	26.0 ±0.8 1	6.0± 0.48	22.0 ±0.6 3	8.0± 0.75	18.0 ±0.5 4
<i>S. hominis</i> s 19	27.0 ±0.5 4	6.0± 0.53	23.± 0.89	32.0 ±1.3	30.0 ±0.8 3	24.0 ±0.7 1	23.0 ±0.4 7	17.0 ±0.9 8	26.0 ±0.5 3	17.0 ±0.8 1	24.0 ±0.5 2

Продолжение таблица 7

<i>S. agalacticae</i> 3984	11.0± 1.1	6.0±0 .98	25.0± 1.6	29.0± 0.51	31.0± 0.41	6.0±0 .48	27.0± 0.75	6.0±0 .74	28.0± 1.26	6.0±0 .98	7.0±0 .51
<i>S. mutans</i> s 21	16.0± 0.51	7.0±0 .83	20.0± 1.16	25.0± 1.72	26.0± 1.32	16.0± 0.4	22.0± 0.75	19.0± 1.7	25.0± 0.63	8.0±0 .71	17.0± 0.54
<i>K. rhizophila</i> 1542	0	0	21.0± 1.2	25.6± 1.14	26.2± 1.3	0	25.8± 0.83	24.6± 0.54	27.0± 2.0	0	22.2± 0.83
<i>L. acidophilus</i> NK - 1	24.8± 1.09	25.2± 1.6	23.8± 1.9	32.0± 1.58	30.4± 1.14	27.0± 1.58	27.0± 2.0	27.0± 1.58	28.8± 1.64	21.4± 1.51	23.8± 1.3
<i>L. fermentum</i> 21907 3	25.8± 1.48	25.8± 0.83	25.6± 1.14	32.4± 1.14	31.8± 0.83	28.6± 2.1	27.6± 1.14	26.6± 1.94	23.2± 1.3	23.2± 1.3	24.8± 0.83
<i>E. faecalis</i> 5960	22.0± 1.03	0	20.5± 1.04	28.5± 0.54	31.0± 0.89	25.0± 0.51	26.5± 0.81	0	24.0± 0.75	0	0
<i>E. avium</i> 1669	21.0± 0.63	6.0±1 .18	23.0± 0.41	30.0± 0.51	32.5± 0.81	28.0± 0.75	25.0± 0.51	0	26.0± 0.63	0	0
<i>E. cloacae</i> 6392	12.5± 0.83	11.0± 0.51	22.0± 0.82	28.0± 0.89	26.0± 0.52	22.5± 1.2	28.5± 0.82	0	22.0± 0.62	0	7.0±0 .53

Продолжение таблица 7

<i>S. aureus</i>	25.0±	23.0±	19.0±	28.0±	27.0±	19.0±	24.0±	22.0±	20.0±	19.0±	21.0±
AT	0.41	0.89	1.41	1.96	0.54	0.98	1.37	0.63	0.75	0.75	0.84
TC											
653											
8											
<i>E. coli</i>	23.4±	24.8±	26.8±	23.2±	25.4±	22.0±	25.4±	14.6±	30.6±	24.8±	21.4±
AT	1,14	0.83	1.3	1.3	1.67	1.58	1.14	1.14	0.89	0.83	1.14
CC											
259											
22											

Примечание: зоны задержки роста указаны в мм

Значение ИМЛЮ для исследуемых культур: *E. faecalis* 5960 (TE, CAC, AMP, TR; MDRI = 0,364), *E. avium* 1669 (TE, CAC, AMP, TR; MDRI = 0,364), *E. cloacae* 6392 (NIT, TE, CAC, AMP, TR; MDRI = 0,455), *K. oxytoca* 3003 (TE, AMP, CAZ, CAC, TR; MDRI = 0,364), *M. catarrhalis* 4222 (NIT, CAZ, AMP, TR; MDRI = 0,364), *M. morgani* 1543 (NIT, TE, FO, AMP, TR; MDRI = 0,455), *P. mirabilis* 1543 (TE, AMP, TR; MDRI = 0,273), *P. aeruginosa* 3057 (NIT, TE, CAZ, AMP, TR; MDRI = 0,455), *S. aureus* – 4785 (NIT, CAZ, CAC, AMP, TR; MDRI = 0,455), *S. aureus* ATTC 6538 (MDRI = 0,000), *S. simulans* 5882 (CAZ, CAC, AMP; MDRI = 0,273), *S. hominis* – 19 (TE; MDRI = 0,182), *S. agalacticae* – 3984 (NIT)., TE, CAZ, CAC, AMP, TR; MDRI = 0,545), *S. mutans* – 21 (TE, AMP; MDRI = 0,273).

Результаты определения антибиотикорезистентности диско – диффузионным методом Кирби –Бауэра для УПКП (*E. coli* subsp.) штаммов: 884, 1072, 1260, 1252, 1522, 1524, 1534, 1579, 1629, 1664, 1735, 2181, 2183, 2260, 2323, 2376, 2595, 2667, 2757, 2841, 6508, 6387, 70 – 19, 118 – 19, 151 – 19, 226 – 19, 3003, 3040, 3041, 3057, 3144, 3243, 3359, 3360, 3366, 3377, 3478, 606, 3645, 3721, 4183, 4184, 4269, 4461, 4770, 6123, 4840, 7527, 5045, 5193, 5221,

5628, 5629, 5632, 5633, 5795, 5843, 5846, 5878, 5886, 5896, 5962, 5964, 7362, 6955, 6993, 6941, 7561, 7534, 6080, представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Спектр антибиотикорезистентности штаммов УПКП (мм±m)

№ Штам ма	CAZ	TR	CTR	FO	CZ	AMC	CAC	TE	IPM	CIP	AMP	NIT
884	22±1.5 2	33±1.1 8	11±0.8 5	33±1.3 8	0	0	26±0.7 1	0	33±1.1 4	33±1.5 8	0	23±1.5 8
1072	14±0.7 8	34±0.5 5	0	35±1.4 3	0	14±0.5 8	21±1	23±1.3	17±1.5 8	19±1.1 4	0	23±1.3
1260	23±0.7 5	34±0.9 8	30±0.9 8	28±1.5 6	0	0	26±0.8 4	29±1.4 8	28±1.1 4	32±1.5 2	12±1.4 1	21±0.8 4
1252	22±0.4 5	28±1.2 1	30±1.0 9	26±0.8 4	24±1.3 1	17±1.5 8	24±0.8 4	24±0.4 5	29±0.7 1	30±1.1 4	24±0.4 5	21±0.8 9
1522	8±0.46	0	9±0.96	21±1.5 8	0	0	21±0.8 4	8±0.84	22±0.4 5	24±0.8 4	0	20±1.4 8
1524	22±0.7 1	28±1.5 6	26±1.0 6	24±1.0 9	22±1.1 4	15±1.1 4	23±1.3 4	13±1.2 9	26±1.6 4	28±1.1 6	26±1.3 3	21±0.8 7
1534	0	0	0	21±1.5 2	0	0	17±1.1 4	0	18±1.6 7	11±0.5	0	21±0.8 4
1579	22±1.5 2	0	14±1.0 4	27±1.1 4	0	0	24±0.4 5	9±0.56	26±0.5 5	25±1.6 7	0	21±1.4 8
1629	16±0.8 1	31±0.9	13±1.4 1	24±1.1 7	0	0	24±1.4 8	8±0.71	17±0.8 6	15±1.3 4	0	22±1.5 2
1664	10±0.8 9	30±0.7 1	11±1.2 6	21±1.2 7	0	0	20±1.5 8	21±0.8 9	15±0.8 7	14±0.5	0	22±0.4 5

Продолжение таблицы 8

173 5	8±1.23	29±1.2 2	8±1.03	20±1.3 9	0	0	21±0.8 4	23±1.3 4	28±0.8 4	30±0.7 1	0	20±0.8 4
218 1	24±0.4 5	34±1.2 9	30±1.3 2	28±1.4 1	25±1.5 3	20±0.7 7	26±0.4 5	22±1.4 1	30±0.7 1	29±0.9	27±1.2 9	24±0.4 5
218 3	0	31±0.7 7	12±1.3 9	25±1.0 8	0	0	0	21±1.3	29±1.2 2	31±1.8 1	0	22±0.4 5
226 0	22±0.4 5	34±1.4 5	32±1.3 2	36±1.2 3	35±0.6 7	18±1.3	29±0.8 4	29±0.7 1	39±0.7 6	37±1.1 4	25±0.5 5	27±1.4 8
232 3	22±0.7 1	33±1.0 5	13±1.0 6	26±1.0 6	0	0	24±1.4 8	22±0.4 5	28±1.1 4	34±1.5 2	0	21±1.6 7
237 6	9±1.09	0	10±1.2 1	25±1.3 2	0	0	23±1.3 4	19±1.3 4	16±1.6 7	11±0.4 5	0	22±1.5 2
259 5	25±1.5 2	31±0.7	30±1.1 4	30±0.8 4	27±1.5 8	16±0.7 8	28±1.1 4	20±0.8 4	30±1.1 4	33±1.4 8	28±1.3	25±1.6 7
266 7	22±1.2 5	31±1.5 7	28±1.5 1	25±1.5 8	25±0.4 5	19±1	26±0.5 5	20±1.1 4	27±1.3	31±0.5 5	28±1	24±1.3 1
275 7	0	0	23±1.3	25±1.1 4	0	0	0	0	23±0.8 4	28±1.1 4	0	22±0.4 5
284 1	26±1.3 8	33±1.5 3	29±1.4 2	31±1	27±1.3 1	17±1.1 4	28±0.5 6	22±0.4 5	30±0.7 1	33±1.3 1	29±1.2 2	22±0.5 5
650 8	26±0.9 8	0	24±1.0 9	35±1.6 3	0	0	25±0.4 5	11±0.4 5	17±0.8 6	19±1.3	10±0.8 9	0
638 7	25±1.2 1	0	32±1.3 2	29±0.7 1	29±1.5 2	18±1.5 2	27±1.3	0	30±1.4 1	31±1.1 4	29±1.4 8	21±1.1 4

Продолжение таблицы 8

70 - 19	22±1.5 2	0	29±1.1 2	37±0.8 9	22±1.5 2	0	25±1.6 7	10±0.8 9	19±1.3	21±0.8 7	0	13±0.4 5
118 - 19	0	37±1.6 2	10±0.8 9	28±1.1 6	0	0	0	10±1.3	32±0.8 9	40±0.8 2	0	24±0.4 5
151 - 19	26±1.1 4	31±1.1 8	31±1.4 3	31±0.8 4	24±0.4 5	0	27±1.3 1	21±1.1 4	24±1.4 8	26±1.1	10±1.3	22±0.7 1
226 - 19	13±0.9 8	33±1.0 8	12±1.1 3	28±1.1 4	0	0	22±1.5 2	23±0.8 4	18±0.8 4	15±1.3 4	0	17±1.1 4
300 3	26±1.2 4	36±1.2 1	34±1.2 4	24±1.5 5	17±1.6 7	0	27±1.2 9	11±1.0 9	33±1.1 4	36±1.6 4	0	24±1.4 8
304 0	26±1.1 6	0	33±1.3 2	24±0.8 9	27±1.4 8	0	28±0.8 4	0	24±1.4 1	22±1.5 2	27±1.3 1	21±0.8 4
304 1	27±1.5 8	0	34±1.5 2	26±0.8 4	24±1.4 8	0	29±1.4 8	22±1.5 2	33±0.7 1	35±1	0	25±0.8 8
305 7	17±1.5 8	0	16±0.8 9	28±0.8 4	0	0	26±0.5 5	10±0.8 4	20±1.1 4	16±0.8 4	0	24±1.4 8
314 4	25±0.4 5	0	30±1.0 2	28±1.1 4	22±1.5 2	0	25±0.4 5	22±1.5 2	19±1.3 4	20±1.3	0	11±0.4 5
324 3	27±1.4 8	36±1.7 6	34±0.9 5	28±1.3	28±1.3	18±0.7 1	29±1.2 2	24±1.3 1	24±0.4 5	20±1.3	13±1.1 4	24±1.4 1
335 9	30±1.1	37±1.6 4	36±1.0 4	28±0.5 6	29±0.7 1	17±0.8 9	30±0.7 1	23±1.3 4	30±1.4 1	32±1.5 2	32±0.4 5	22±0.4 5
336 0	26±1.5 6	0	31±1.1	27±1.5 8	23±0.8 9	0	27±1.5 8	22±0.4 5	31±1.6 4	34±0.5 5	0	22±1.5 2

Продолжение таблицы 8

336 6	27±1.1 7	32±1.0 8	32±1.2 1	30±1.1 7	26±0.8 4	10±0.5 5	29±0.7 1	21±1.1 4	31±1.8 1	33±1.5 8	0	22±0.7 1
337 7	26±1.1 4	0	30±1.4 1	32±0.8 9	27±1.1 4	0	28±1.1 4	10±0.8 4	32±0.8 9	34±1.2 2	0	25±1.5 2
347 8	14±0.9 3	0	10±1.1 4	30±0.8 4	0	0	19±1.3 4	22±1.5 2	26±0.5 5	26±0.8 4	0	23±1.3
606 9	23±1.1 3	33±1.4 4	31±1.6 4	33±1.1 4	24±0.8 4	11±0.4 5	25±0.4 5	24±0.8 4	32±0.4 5	38±0.4 5	28±1.5 8	25±1.1 4
364 5	27±1.2 4	33±0.7 1	34±1.1 3	32±0.7 1	25±1.5 2	0	28±0.5 6	25±1.5 2	17±1.1 4	17±1.5 8	0	23±1.3
372 1	0	35±0.7 6	12±1.2 9	30±0.8 4	0	0	20±1.1 4	20±0.8 4	30±0.8 4	34±0.5 5	0	23±0.8 4
418 3	28±1.2 6	0	34±1.1 9	27±1.1 4	25±0.4 5	0	30±1.4 1	0	19±1.3 7	18±1.6 7	0	25±0.8 8
418 4	17±1.3 3	35±0.9 7	16±1.1 5	29±1.5 2	0	0	24±1.4 1	21±1	30±0.4 5	34±0.8 8	0	23±1.3 1
426 9	0	37±0.8 6	12±1.2 9	36±1.3 4	0	0	0	11±0.4 5	27±1.5 8	30±1.1 4	0	24±1.4 8
446 1	26±1.6 4	37±1.3	35±1.6	31±1.3 7	26±1.1	13±1	26±0.5 5	23±1.3 4	34±1.5 2	36±1.6 4	28±0.5 6	24±1.4 8
477 0	29±1.0 1	30±0.8 9	35±1.3 9	30±0.8 9	29±1.2 2	19±1.5 2	29±1.5 2	20±1.4 8	35±0.8 9	36±0.7 1	30±0.7 7	22±1.5 2
612 3	23±1.3	30±0.9 7	31±1.3 4	27±1.3 1	25±1.5 2	16±1.4 1	26±1.6 4	19±1.3	35±1.4 9	30±0.9 8	23	22±0.7 1

Продолжение таблицы 8

484 0	10±0.8 9	33±0.7 7	12±0.9 4	37±1.3 1	0	0	22±0.7 1	23±0.8 4	16±1.6 7	13±1.4 8	0	23±1.8 2
752 7	19±0.8 3	0	16±1.3 3	36±1.7 8	0	0	25±1.5 2	22±0.7 1	30±0.9 8	30±0.7 1	0	23±1.3
504 5	28±1.7 9	32±1.5 4	32±1.1 4	28±1.1 6	29±1.2 2	19±1.0 6	28±1.1 4	26±1.1 4	34±1.1 4	36±1.5 2	29±1.4 8	23±1.8 2
519 3	28±1.3	32±1.2 3	36±1.0 3	33±1.3 4	26±1.6 4	0	31±1.6 4	25±1.6 7	27±1.1 4	24±0.4 5	0	26±0.8 4
522 1	29±1.6 9	32±1.4 4	35±1.0 7	32±0.8	28±1.7 9	15±1.3 4	29±0.9	25±0.4 5	34±0.5 5	38±1.2 2	28±1.3	26±0.7 1
562 8	26±0.9 2	37±1.3 2	32±1.1 3	34±1.2 9	30±0.9 8	16±1.6 7	25±1.6 7	25±0.5 5	33±1.1 4	36±1.5 2	30±1.4 1	24±0.8 4
562 9	30±1.0 4	34±1.0 6	37±1.6 1	33±0.7	29±0.9	19±1.3	30±1.1 4	28±1.3	33±0.7 1	39±0.8 4	30±1.6 7	26±1.6 4
563 2	38±1.5 5	34±1.1 7	37±1.3 4	39±0.7 1	30±0.7 1	18±0.8 4	30±0.7 1	28±0.8 4	35±0.8 9	39±1.4 8	30±0.7 1	25±1.6 7
563 3	21±1.1 9	37±1.7 7	16±0.7	34±0.8 4	0	0	25±1.6 7	0	32±0.8 9	36±1.5 2	0	28±0.8 4
579 5	27±0.9 9	37±1.1 6	37±0.7 2	33±0.7 9	30±0.9 8	19±1	30±1.4 1	28±1.7 9	37±1.1 4	39±1.1 4	29±0.7 1	28±1.1 4
584 3	0	33±0.7 1	11±0.8 4	35±1.1 6	0	0	22±0.4 5	20±1.5 2	19±1.3	19±1.3 4	0	24±1.4 1
584 6	10±0.8 9	33±0.9 5	0	34±1.1 9	0	0	22±1.4 1	22±0.7 1	19±1.3 4	16±1.1 4	11±0.4 5	23±0.8 4

Продолжение таблицы 8

587 8	13±1.1 2	0	16±1.5 2	29±1.3 3	0	0	25±1.6 7	0	21±0.8 4	18±0.8 4	0	25±0.4 5
588 6	25±1.3 4	0	24±1.1 9	30±0.7 9	22±0.4 5	0	26±0.8 4	0	30±1.1 4	31±1.1 4	0	19±1.3 4
589 6	26±0.6 8	0	31±1.2 2	26±1.3	23±1.3 4	0	27±1.2 9	23±0.8 4	25±0.4 5	28±0.5 6	0	24±1.3 1
596 2	29±1.6 4	32±1.4 5	33±1.0 5	30±0.7 6	25±0.4 5	17±1.3 4	28±0.5 6	10±0.5 5	29±1.4 8	30±1.1 4	30±0.8 4	22±0.4 5
596 4	30±0.7 1	0	31±1.0 4	28±1.3 4	24±1.4 8	0	22±1.4 1	22±1.5 2	22±1.4 1	27±1.3	16±1.1 4	25±1.3 4
736 2	24±1.2 4	30±1.3 4	20±1.1 7	33±0.8 9	26±0.7 1	16±0.5 5	28±0.8 4	23±1.3	32±0.4 5	31±1.6 4	27±1.3 1	21±0.8 9
695 5	0	29±1.5 6	0	34±0.8 4	0	0	0	24±1.4 8	18±0.8 4	13±1.1 4	0	23±1.3 4
699 3	26±1.3 4	0	34±0.7 9	34±1.3	25±1.6 7	0	27±1.4 8	12±0.4 5	27±1.5 8	30±1.4 1	0	21±1.1 4
694 1	25±1.5 4	0	30±1.2 4	35±1.4 9	26±1.1	17±1.5 8	25±1.6 7	11±0.8 4	19±1.3 4	17±1	26±0.7 1	17±1.1 4
756 1	10±0.6 5	34±1.2 2	10±0.9 8	31±1.2 7	0	0	0	0	33±1.5 8	34±0.8 4	0	25±0.8 4
753 4	0	34±1.2 7	0	33±0.8 7	0	0	22±0.7 1	21±0.8 4	20±1.3	19±1.3	0	24±1.3 1
608 0	25±1.0 8	0	0	25±0.8 8	0	0	21±0.8 7	10±1.1 4	19±1.3	13±1.3	0	22±0.7 1

Примечание: зоны задержки роста указаны в мм

Анализируя полученные данные было определено, что наибольшее количество изолятов УПКП резистентны к: 45 штаммов резистентны к амоксиклаву концентрацией 30 мкг / диск, 41 штамм резистентен к

ампициллину, концентрацией 25 мкг / диск; 31 штамм резистентен к цефазолину, концентрацией 30 мкг / диск. Данные о распределении резистентности представлены на рисунке 21. К таким антибиотикам, как фосфомицин, имипенем и ципрофлоксацин, резистентность не определялась.

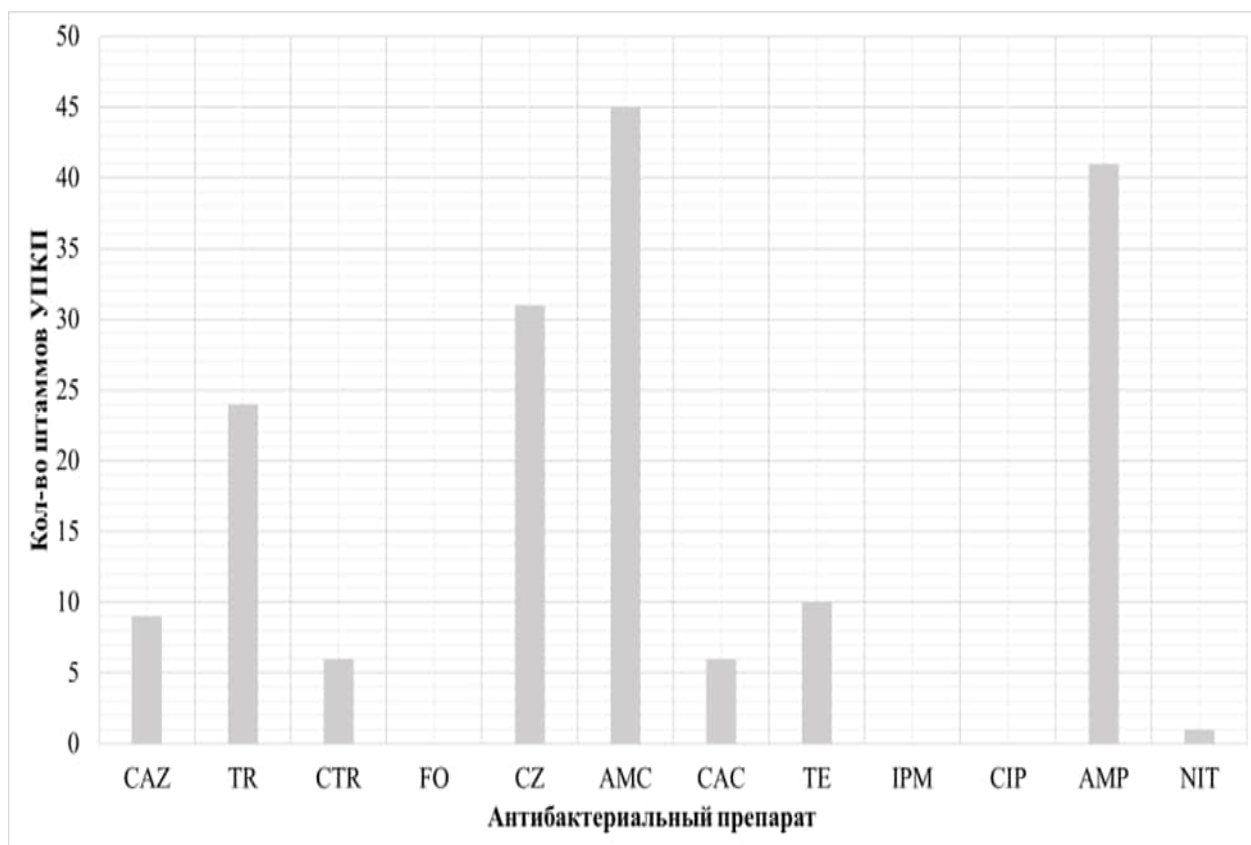


Рисунок 21 – Гистограмма, отображающая количественное распределение штаммов УПКП резистентных к антибиотикам

Примечание: CAZ - Цефтазидим 30 мкг / диск, TR - Триметоприм 30 мкг / диск, CTR - Цефтриаксон 30 мкг / диск, FO – Фосфомицин 200мкг / диск, CZ – Цефазолин 30 мкг / диск, AMC - Амоксилав 30 мкг / диск, SAC - Цефтазидим с клавулановой кислотой 30 / 10 мкг / диск, TE - Тетрациклин 30 мкг / диск, IMP - Имипенем 10 мкг / диск, CIP - Ципрофлоксацин 30 мкг / диск, AMP - Ампициллин 25 мкг / диск, NIT - Нитрофурантоин 200 мкг / диск

По результатам данного этапа исследования была определена чувствительность к антибактериальным препаратам исследуемых микроорганизмов, также был посчитан ИМЛР для каждого штамма.

5. 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ

Минимальную концентрацию hLO, ингибирующую рост бактерий, определяли после 24-часового культивирования исследуемых

микроорганизмов на питательном бульоне. Полученные результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Определение минимальной ингибирующей концентрации hLO для испытуемых микроорганизмов методом серийных разведений в бульоне

Микроорганизм, штамм	Концентрация фермента (А = 50 Е/мг) в растворе г/мл							КРК	КСС
	0,1	0,075	0,05	0,025	0,01	0,001	0,0001		
УПКП (<i>E. coli</i> subsp.)	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i> M17	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i> 1449	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>K. oxytoca</i> 3003	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>A.xylosoxidans</i> 4892	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>A. baumannii</i> 5841	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>C. freundii</i> 426	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>M. catarrhalis</i> 4222	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>M. morgani</i> 1543	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>P. mirabilis</i> 1543	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>P.aeruginosa</i> 3057	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. marcescens</i> 6441	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>S. aureus</i> 4785	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>S. aureus</i> ATTC 6538	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. simulans</i> 5882	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>S. hominis</i> 19	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>S. agalacticae</i> 3984	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. mutans</i> - 21	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>K. rhizophila</i> 1542	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> NK - 1	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. fermentum</i> 219073	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i> 5960	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. avium</i> 1669	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>E. cloacae</i> 6392	-	-	-	-	+	+	+	+	-

Продолжение таблицы 9

<i>C. albicans</i> subsp.	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Примечание: КРК – контроль роста культуры, КСС – контроль стерильности среды. «+» - рост культуры на среде визуально определяется, «-» - рост культуры на среде визуально не определяется

Из данных таблицы 9 видно, что антагонистическая активность hLO наиболее выражена по отношению к грамположительным микроорганизмам и распределена в диапазоне концентраций от 0,1 г/мл до 0,001 г/мл (Таблица 9). Для грамотрицательных бактерий минимальная ингибирующая концентрация составила 0,01 г/мл. В данном эксперименте антагонистической активности в отношении дрожжевых грибов рода *Candida* обнаружено не было.

Также на данном этапе эксперимента было исследовано противомикробное действие hLO на плотной питательной среде с помощью лунко – диффузионного метода (Таблица 10).

Таблица 10 – Антагонистическое действие hLO по отношению к исследуемым микроорганизмам, определение лунко – диффузионным методом (мм±m)

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

Продолжение таблицы 10

<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
VIKП (<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
<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

Как видно из таблицы 10, антагонистическая активность LO и при использовании данного метода наиболее выражена по отношению к грамположительным, чем к грамотрицательным бактериям. Пример лунко – диффузионного метода и антагонистического действия hLO на микроорганизмы представлен на рисунке 22.

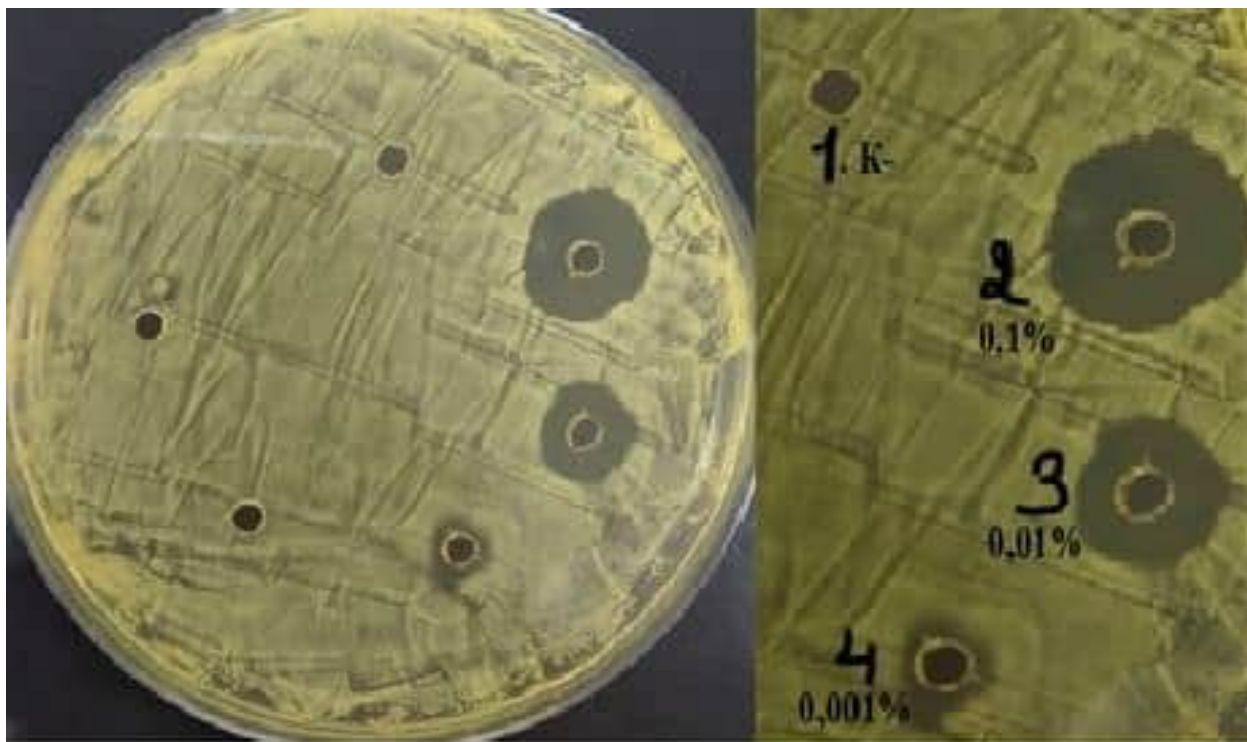


Рисунок 22 – Влияния различных концентрации hLO на увеличение зоны задержки роста культуры *S. hominis* (в качестве примера проведения эксперимента)

Для дрожжевых грибов рода *Candida* минимальную ингибирующую концентрацию определить не удалось, что позволяет предположить наличие у данных микроорганизмов естественной резистентности к LO. Также следует отметить, что hLO обладает определенным спектром действия, который проявляется в более выраженной антагонистической активности в отношении грамположительных микроорганизмов (Рисунок 23). На данном этапе исследования была определена антагонистическая активность hLO в отношении исследуемых микроорганизмов. Противомикробная активность hLO наиболее выражена по отношению к грамположительным микроорганизмам.

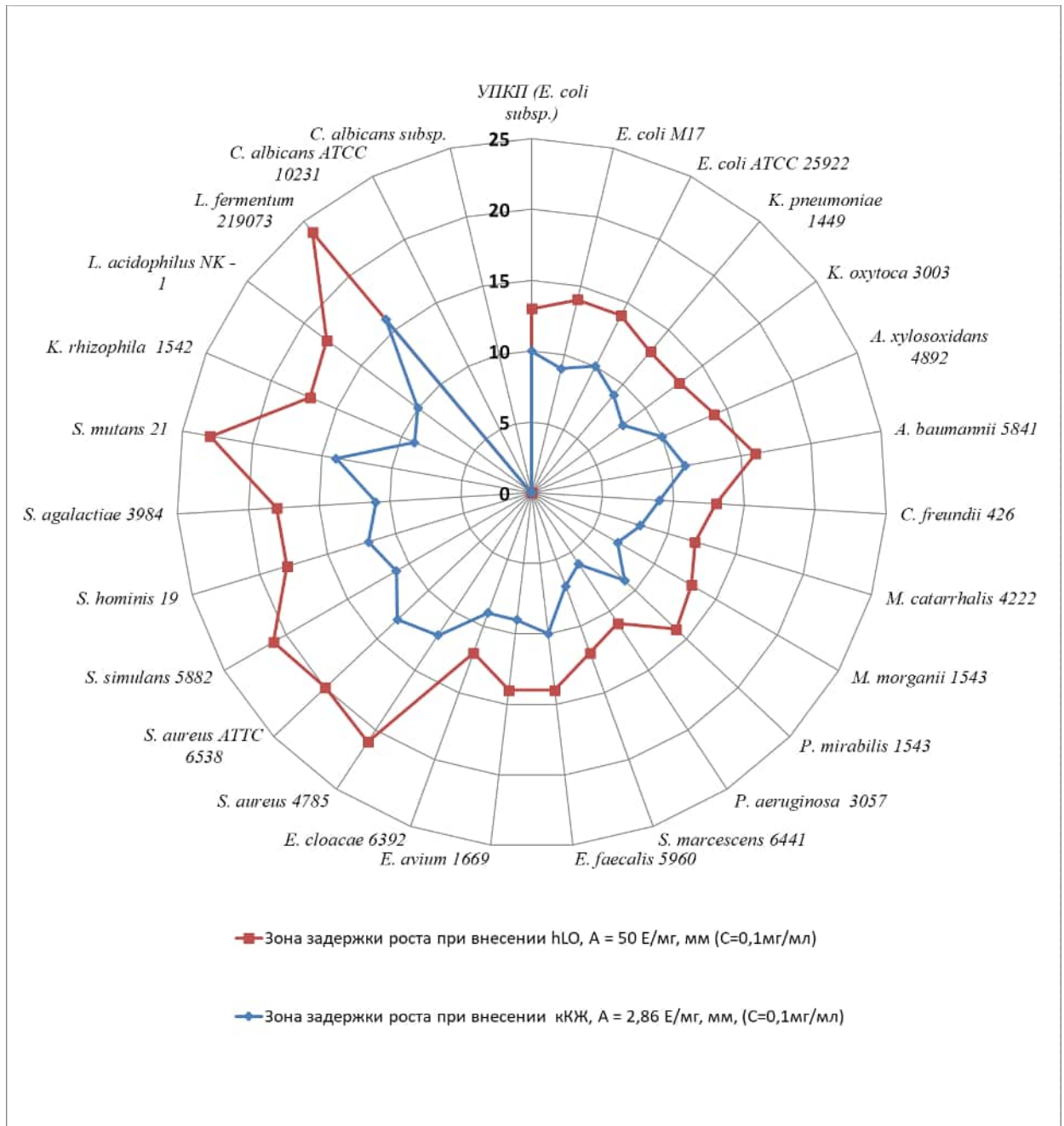


Рисунок 23 – Сравнение чувствительности исследуемых микроорганизмов к hLO и кКЖ

5. 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ И КОНЦЕНТРАТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI F - 180 ПО ОТНОШЕНИЮ К УПКП

В работе нами было исследована антагонистическая активность hLO и кКЖ, содержащего LO. hLO имел активностью 50,0 Ед / мг и был получен при промышленном культивировании. LO, полученный нами при лабораторном

культивировании и ультрафильтрации, имел активность, определяемую в диапазоне значений 2,86 – 2,88 Ед/мг. Активность по отношению к полирезистентным УПКП этих двух объектов исследования представлена на рисунке 24.

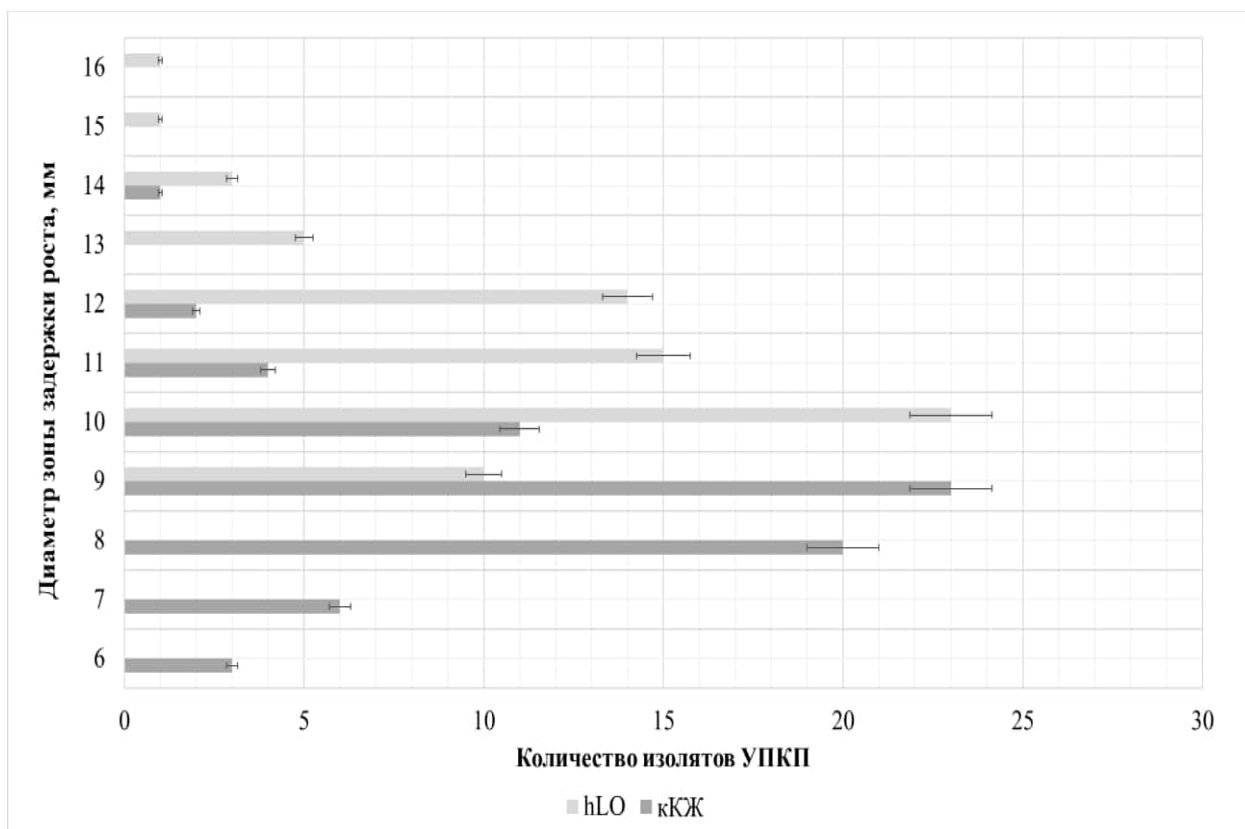


Рисунок 24 – Распределение чувствительности штаммов УПКП по отношению к hLO и кКЖ *Trichoderma harzianum* Rifai – 180

Из рисунка 24 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.

Учитывая, что штаммы УПКП были резистентны хотя бы к одному из антибиотиков, а некоторые к 7 и более антибактериальным препаратам, выявленная антагонистическая активность фермента L – лизин – α – оксидазы имеет прямую практическую значимость.

Для подтверждения эффективности действия образцов фермента (hLO и кКЖ) на полирезистентные УПКП был высчитан индекс лекарственной мультирезистентности (ИЛМР) для 70 штаммов и рассчитана корреляция зависимости эффективности гомогенного фермента и концентрата культуральной жидкости от выраженности антибиотикорезистентности штаммов УПКП. Данные представлены на рисунке 25.

Была выявлена корреляционная зависимость эффективности фермента и культуральной жидкости от выраженности антибиотикорезистентности штаммов УПКП. Для этого использовали расчет корреляции Пирсона [140] по формуле $r = \frac{\Sigma(x-m_x)(y-m_y)}{\sqrt{\Sigma(x-m_x)^2 \Sigma(y-m_y)^2}}$, а также производился расчет t – критерия Стьюдента [91] для подтверждения достоверности полученных результатов, по формуле $t = \frac{r}{\sqrt{1-r^2}} \sqrt{n-2}$.

Были получены следующие значения:

hLO ИЛМР -0,358 (p = 0,002); кКЖ ИЛМР -0,315 (p=0,008), кКЖ/hLO 0,849 (p =0,000).

Корреляции между ИЛМР и hLO, а также ИЛМР и кКЖ, значимые и равные -0,358 (p=0,002) и -0,315 (p=0,008) соответственно. То есть чем выше был индекс резистентности УПКП, тем больше была антагонистическая активность hLO и кКЖ (Рисунок 25).

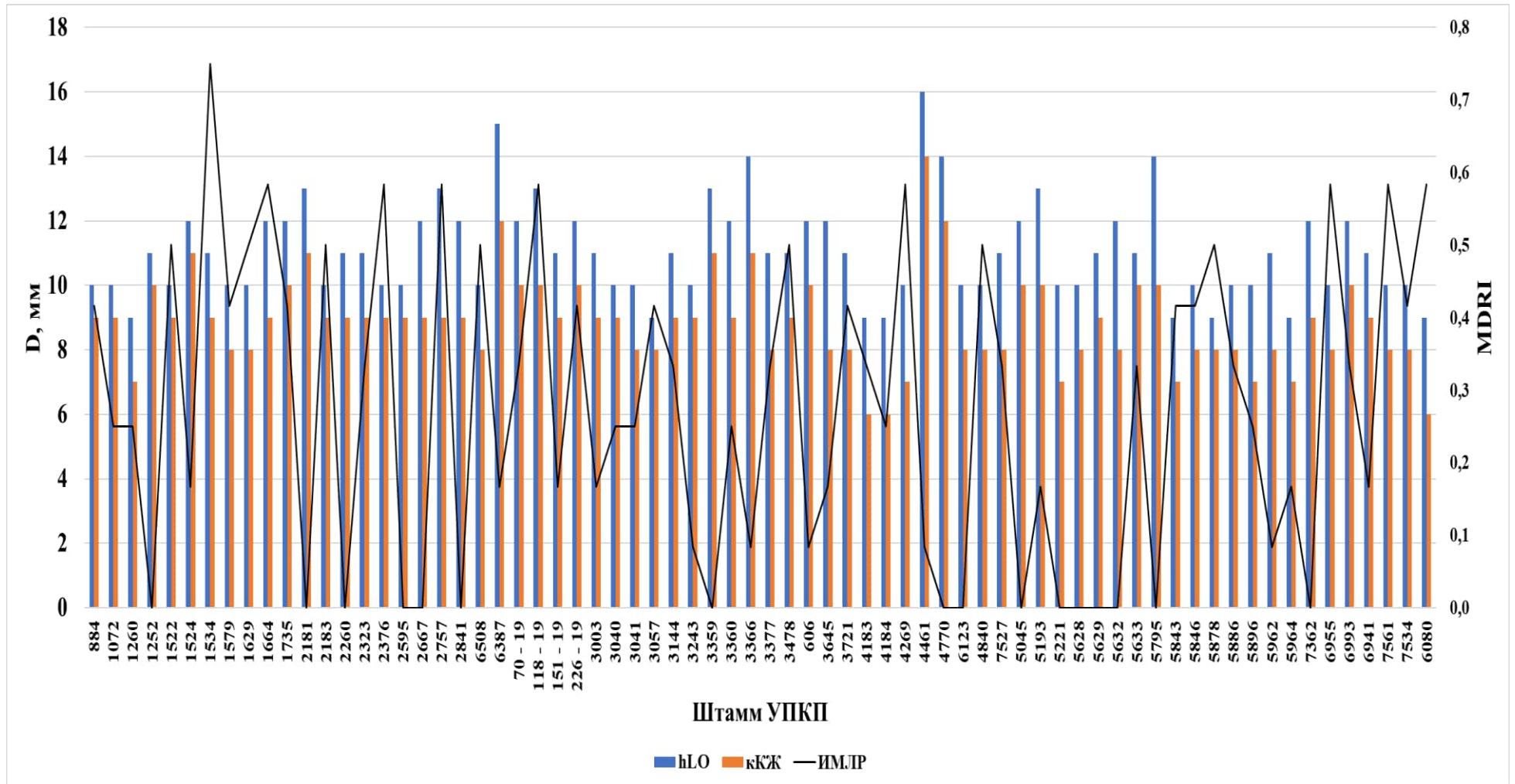


Рисунок 25 – Анализ результатов полученных зон задержки роста при действии hLO и кКЖ *Trichoderma harzianum* Rifai – 180 с ИМЛР у штаммов УПКП

5. 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* НА КОНГО – КРАСНОМ АГАРЕ (CRA)

Метод определения биопленкообразования на Конго – красном агаре [66, 72, 156], основан на способности микроорганизмов, в частности *E. coli*, синтезировать curli - волокна (белки амилоидной группы), являющиеся важными структурными компонентами при формировании биопленок. Эти белки способны связываться с красителем, входящим в состав среды. Специфический черный цвет колоний обусловлен метаболизмом сахарозы, в результате ферментации которой образуется кислота. В связи с чем изменяется рН среды на кислую, что в свою очередь приводит к изменению окраски самой среды или колоний на черный, в случае образования биопленки или биопленкоподобной структуры на поверхности среды.

Способность к биопленкообразованию была изучена у 70 штаммов УПКП. Было установлено, что 22 штамма УПКП не обладают потенциалом к биопленкообразованию при этом видимый рост такой культура УПКП на поверхности Конго-красном агаре выглядел без изменений (Рисунок 26).



Рисунок 26 – Рост штамма УПКП на среде Конго – красный агар, без характерных для данной среды специфического изменения цвета колоний

В то же время 38 штаммов УПКП не давали ярко выраженного положительного результата, но характер роста колонии на среде Конго-красном агаре был похож на положительный результат без специфичного черного окрашивания колоний. Следует отметить, что некоторые из подобных штаммов, хоть и не давали колоний с выраженной цветной реакцией, но при этом имели вкрапления черного цвета. Вероятно, такой результат роста колоний на Конго – красном агаре можно объяснить способностью данных штаммов УПКП образовывать *curls* – волокна, которые формируют внеклеточный матрикс биоплёнки без ферментации сахарозы (Рисунок 27).



Рисунок 27 – Рост штамма УПКП на среде Конго – красный агар, без ярко выраженного положительного результата (без специфичного черного окрашивания)

Только 10 штаммов УПКП из 70 дали выраженный рост колоний со специфическим окрашиванием (Рисунок 28).



Рисунок 28 – Рост штамма УПКП на среде Конго – красный агар со специфическим черным окрашиванием

Таким образом количество штаммов УПКП, которые не дали положительного результата при культивировании на Конго – красном агаре равно 22. Сомнительный результат дали 38 штаммов УПКП. Положительный результат наблюдался только у 10 штаммов УПКП.

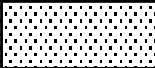
При предварительной инкубации бульонной культуры штаммов УПКП с hLO в концентрациях 0,05 – 0,01 г/мл - ранее описанной МИК, все штаммы УПКП дали отрицательный результат. Инкубация бульонных культур с hLO в концентрациях ниже 0,01 г/мл не показала никакого визуально определяемого эффекта.

На данном этапе исследования была определена способность штаммов УПКП образовывать биопленки на на Конго – красном агаре. Из 70 исследуемых штаммов 22 штамма продемонстрировали биопленкообразование.

5. 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ МИКРОПЛАНШЕТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Для определения способности к биопленкообразованию тестируемые микроорганизмы культивировали в микропланшетах в течение 72 часов. Затем, согласно стандартному протоколу [46, 179], 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 или 450 нм (Таблица 11, Рисунок 29).

Таблица 11 – Планшетный метод определения образования биопленки и подавления образования биопленки при внесении hLO

Повтор 1		1	2	3	4	5	6
	A	0,000	0,150	0,035	0,010	0,077	
	B	0,002	0,200	0,018	0,008	0,071	
	C	0,000	0,210	0,052	0,031	0,030	
	D	0,009	0,240	0,005	0,046	0,026	
	E	0,002	0,872	0,420	0,559	0,184	
	F	0,000	0,680	0,539	0,640	0,397	
	G	0,000	0,639	0,471	0,271	0,418	
	H	0,001	0,620	0,423	0,479	0,289	

Примечание: Ряд А – D: *E. coli* 1072 (УПКП), ряд E – H: *P. aeruginosa* 3057. Лунки А 1– Н 1 – контроль среды, лунки А 2 – Н 2 – контроль культуры, лунки А 3 – Н 5- лунки с культурой микроорганизма и внесенным hLO в конечной концентрации 1 мг/мл (средние значения для двух лунок)

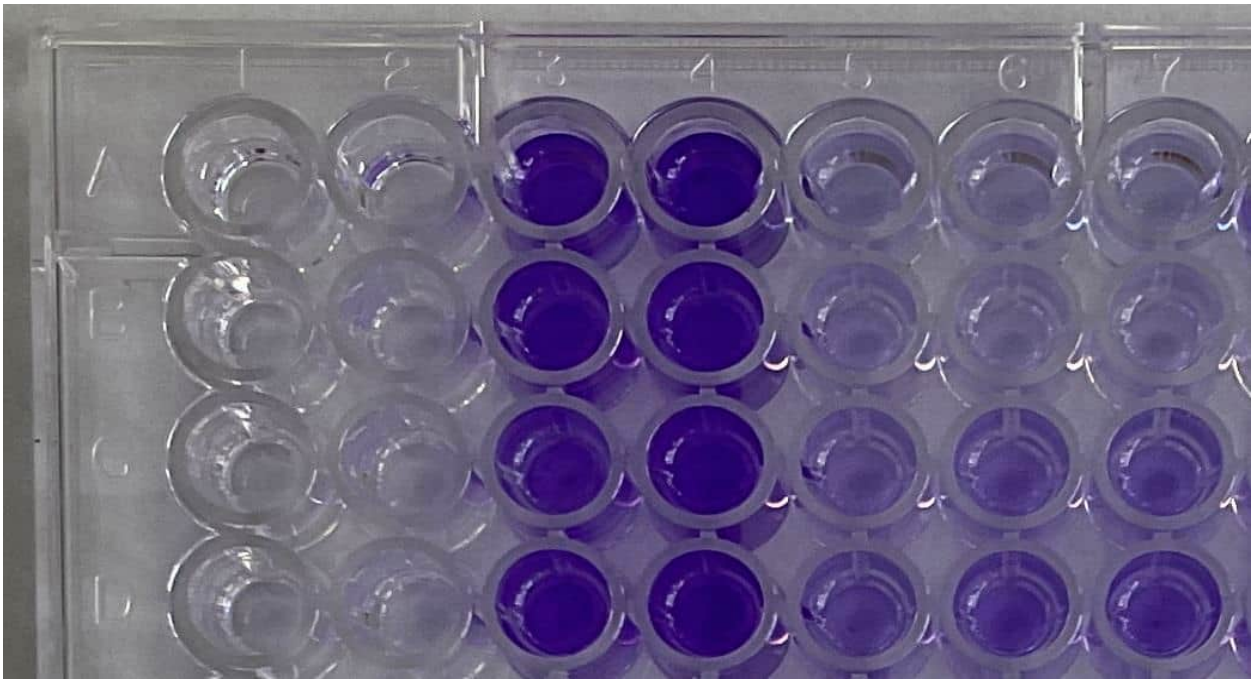


Рисунок 29 – Планшетный метод определения образования биопленки у штамма *S. aureus* ATCC 6538 и подавления биопленкообразования при внесении hLO

Примечание: Лунки А 1 – D 2 – контроль среды, лунки А 3 – D 4 – контроль культуры, лунки А 5 – D 7 - лунки с культурой микроорганизма и внесенным hLO в конечной концентрации 1 мг/мл

Из рисунка 30 видно, что 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 ($M = 0,551 \pm 0,135$), $0,015$). 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 способность к образованию биопленки, что подтверждается данными научной литературы [73, 120].

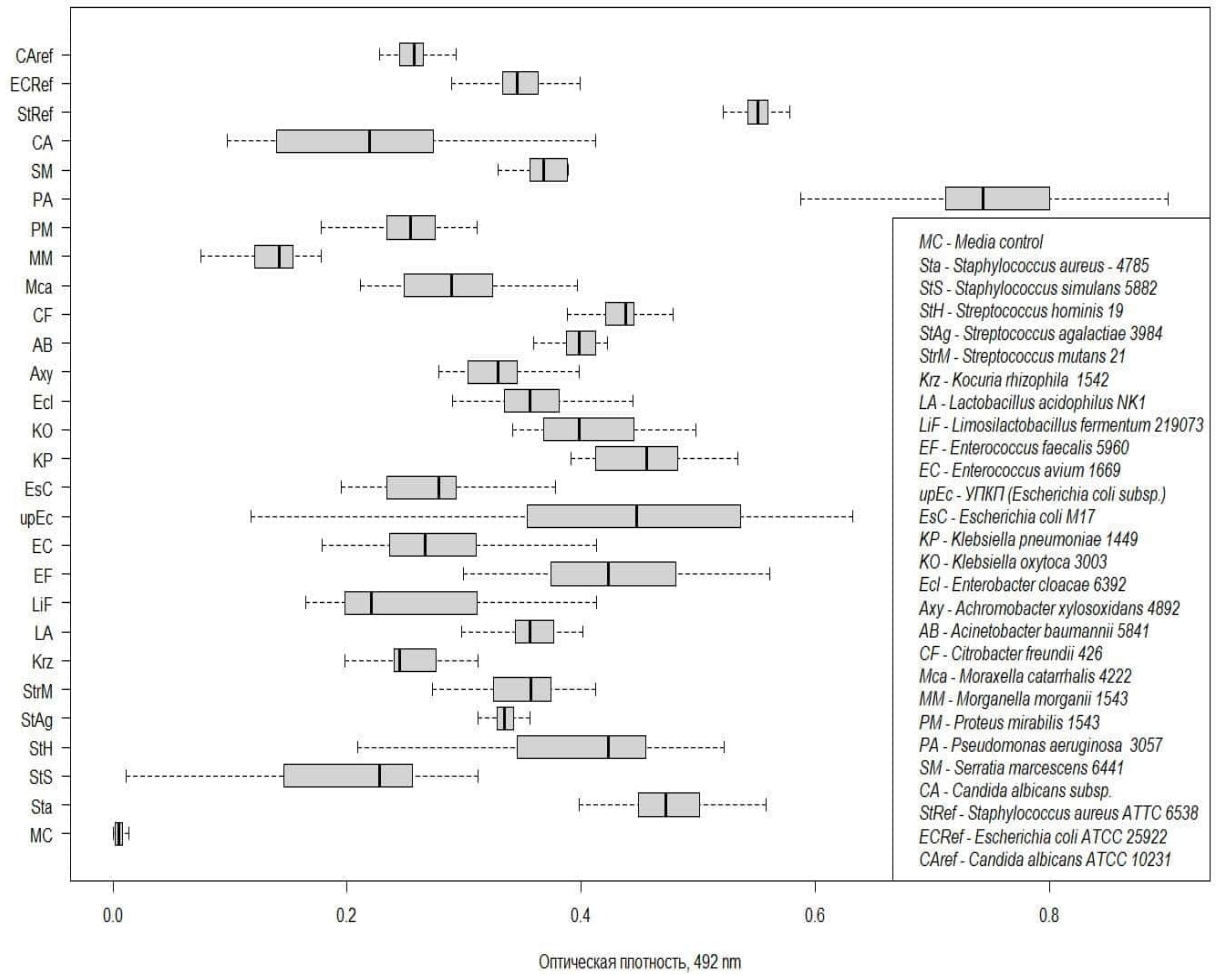


Рисунок 30 – Степень способности к биопленкообразованию у тестируемых микроорганизмов

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* ATTC 6538, ECRef – *Escherichia coli* ATCC 25922, CRef – *Candida albicans* ATCC 10231

5. 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ МЕТОДОМ МИКРОПЛАНШЕТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

При оценки степени влияния кКЖ и hLO на подавление биопленкообразования было установлено, что фермент обладает выраженной способностью подавлять образование биопленок, практически у всех

исследуемых микроорганизмов (до 100%): УПКП (*E. coli subsp.*, среднее значение для 70 штаммов) кКЖ 91%, hLO 99%; *E. coli* - M17 – кКЖ 91%, hLO 99%; *E. coli* ATCC 2582 – кКЖ 93%, hLO 100%; *E. faecalis* 5960 – кКЖ 86%, hLO 95%; *E. avium* 1669 – кКЖ 85%, hLO 94%; *E. cloacae* 6392 – кКЖ 83%, hLO 98%; *M. catarrhalis* 4222 – кКЖ 78%, hLO 86%; *M. morgani* 1543 – кКЖ 66 %, hLO 71%; *P. mirabilis* 1543 – кКЖ 81%, hLO 96%; *P. aeruginosa* 3057 – кКЖ 70%, hLO 82%; *S. aureus* 4785 – кКЖ 82%, hLO 96%; *S. aureus* ATTC 6538 – кКЖ 80%, hLO 94%; *S. simulans* 5882 – кКЖ 78%, hLO 91%; *S. hominis* 19 – кКЖ 90%, hLO 95%; *S. agalacticae* 3984 – кКЖ 90%, hLO 95%; *S. mutans* 21 – кКЖ 92%, hLO 98%. При этом значительно меньший эффект был характерен для штаммов *K. pneumoniae* 1449 – кКЖ 22%, hLO 52%; *K. oxytoca* 3003 – кКЖ 35%, hLO 61%. На дрожжевые грибы *C. albicans subsp.*, существенного эффекта оказано не было – кКЖ 0%, hLO 12% (Рисунок 31).

Необходимо отметить, что высокий процент подавления биопленкообразования был характерен только при внесении образцов фермента на ранних этапах формирования биопленки (от начала эксперимента до 24 часа культивации). На более поздних этапах – от 24-го часа и до 48-го часа культивирования, исследуемые образцы кКЖ и hLO или подавляли биопленкообразование образование в несколько раз, или не влияли на этот процесс. При внесении на 24 часах культивации (Рисунок 32): УПКП (*E. coli subsp.*) – кКЖ 20%, hLO 34%; *E. coli* M17 – кКЖ 23%, hLO 36%; *E. coli* ATCC 2582 – кКЖ 21%, hLO 35%; *E. faecalis* 5960 – кКЖ 28, hLO 32%; *E. avium* 1669 – кКЖ 25%, hLO 28%; *E. cloacae* 6392 – кКЖ 23%, hLO 31%; *K. pneumoniae* 1449 – кКЖ 8%, hLO 17%; *K. oxytoca* 3003 – кКЖ 12%, hLO 23%; *M. catarrhalis* 4222 – кКЖ 28%, hLO 32%; *M. morgani* 1543 – кКЖ 15%, hLO 27%; *P. mirabilis* 1543 – кКЖ 17%, hLO 30%; *P. aeruginosa* 3057 – кКЖ 24%, hLO 30%; *S. aureus* 4785 – кКЖ 32%, hLO 46%; *S. aureus* ATTC 6538 – кКЖ 31%, ГФ – 52%; *S. simulans* 5882 – кКЖ 28%, hLO 40%; *S. hominis* 19 – кКЖ 35%, hLO 42%; *S. agalacticae* 3984 – кКЖ 32%, hLO 51%; *S. mutans* 21 – кКЖ 41%, hLO 56%; *K. rhizophila* 1542 – кКЖ 43%, hLO 61%; *L. acidophilus* НК - 1 – кКЖ 71%, hLO 82%; *L.*

fermentum 219073 – кКЖ 57, hLO 72%; *A. xylosoxidans* 4892 – кКЖ 43, hLO 51; *A. baumannii* 5841 – кКЖ 36%, hLO 42; *C. freundii* 426 – кКЖ 28%, hLO 45%; *S. marcescens* 6441 – кКЖ 36%, hLO 52%; *C. albicans* subsp. – кКЖ и hLO 0%.

При внесении кКЖ *T. harzianum* Rifai F-180 и hLO в питательную среду после 48 часов культивирования микроорганизмов получены следующие результаты: УПКП (*E. coli* subsp.) – кКЖ 5%, hLO 7%; *E. coli* M17 – кКЖ 8%, hLO – 11%; *E. coli* ATCC 2582 – кКЖ 7%, hLO 22%; *E. faecalis* 5960 – кКЖ 6%, hLO 8%; *E. avium* 1669 – кКЖ 7%, hLO 7%; *E. cloacae* 6392 – кКЖ 6%, hLO 9%; *K. pneumoniae* 1449 – кКЖ 0%, hLO 4%; *K. oxytoca* 3003 – кКЖ 0%, hLO 6%; *M. catarrhalis* 4222 – кКЖ 3%, hLO 7%; *M. morgani* 1543 – кКЖ 4%, hLO 11%; *P. mirabilis* 1543 – кКЖ 8%, hLO 13%; *P. aeruginosa* 3057 – кКЖ 2%, hLO 6%; *S. aureus* 4785 – кКЖ 7%, hLO 12%; *S. aureus* ATTC 6538 – кКЖ 5%, hLO 9%; *S. simulans* 5882 – кКЖ 7%, hLO 13%; *S. hominis* 19 – кКЖ 6%, hLO 15%; *S. agalacticae* 3984 – кКЖ 5%, hLO 13%; *S. mutans* 21 – кКЖ 7%, hLO 17%; *K. rhizophila* 1542 – кКЖ 4%, hLO 11%; *L. acidophilus* NK - 1 – кКЖ 12%, hLO 14%; *L. fermentum* - 219073 – кКЖ 10%, hLO 18%; *A. xylosoxidans* 4892 – кКЖ 3%, hLO 9%; *A. baumannii* 5841 – кКЖ 8%, hLO 11%; *C. freundii* 426 – кКЖ 6%, hLO 14%; *S. marcescens* 6441 – кКЖ 4%, hLO 9%; *C. albicans* subsp. – кКЖ 0%, hLO 0% (Рисунок 32 и 33).

На данном этапе исследования было определено ингибирующее действие кКЖ и hLO на подавление биоупленкообразования 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 биоупленки (от начала эксперимента до 24 часа культивации).

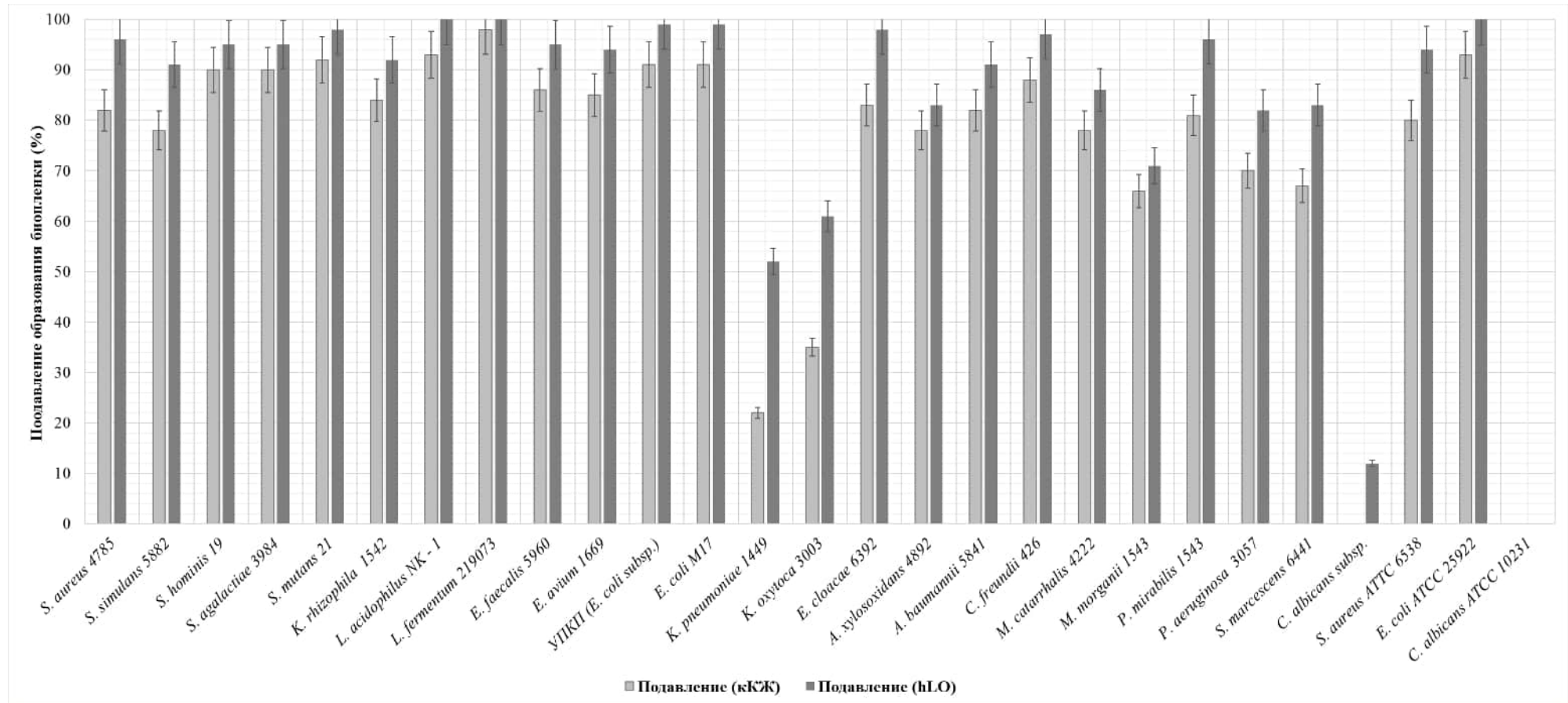


Рисунок 31 – Эффективность подавления биопленкообразования при внесении кКЖ и hLO *T. harzianum* Rifai F-180 в питательную среду в начале эксперимента

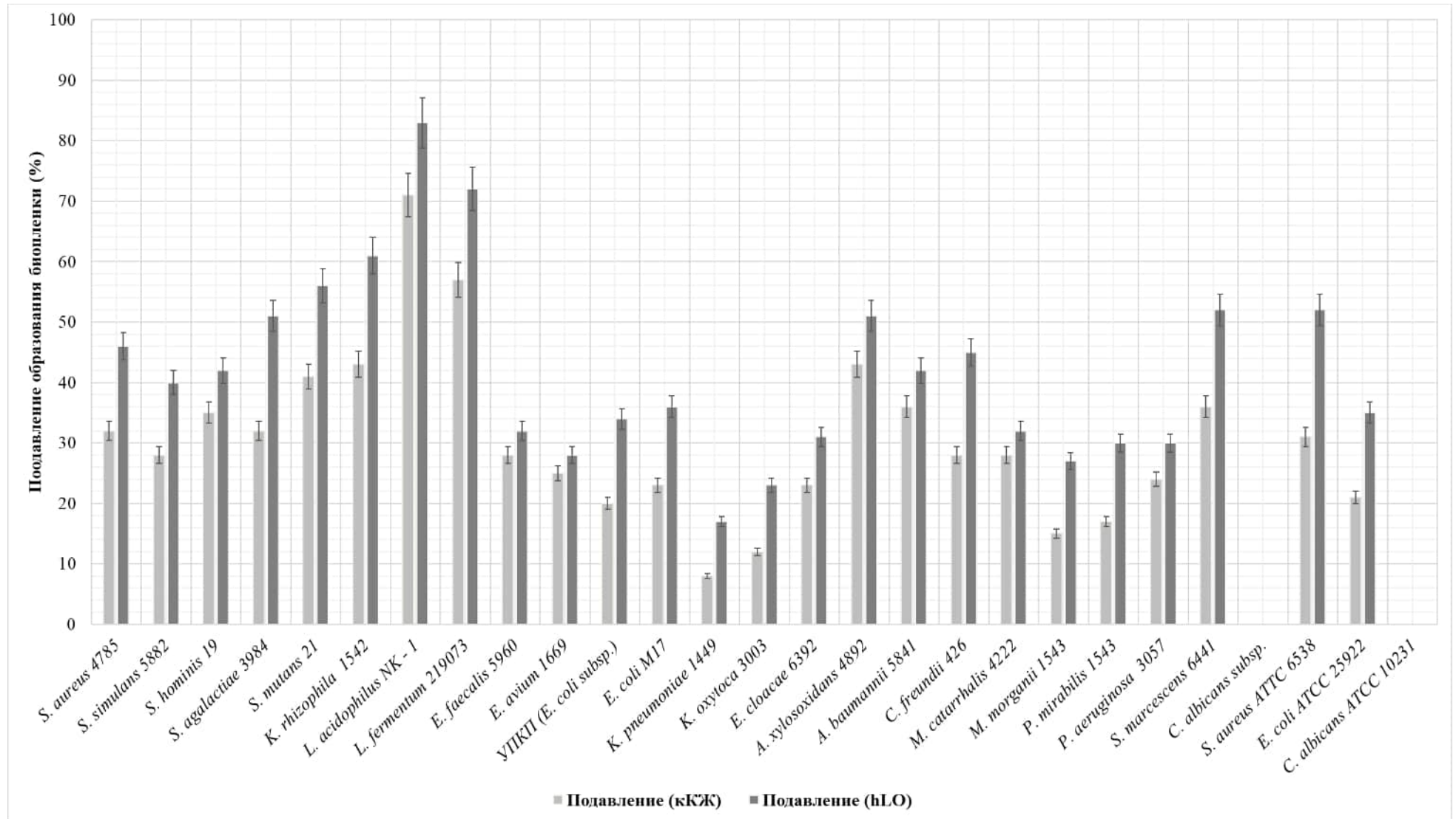


Рисунок 32 – Эффективность подавления биопленкообразования при внесении кКЖ и hLO *T. harzianum* Rifai F-180 в питательную среду на этапе 24-х часового культивирования

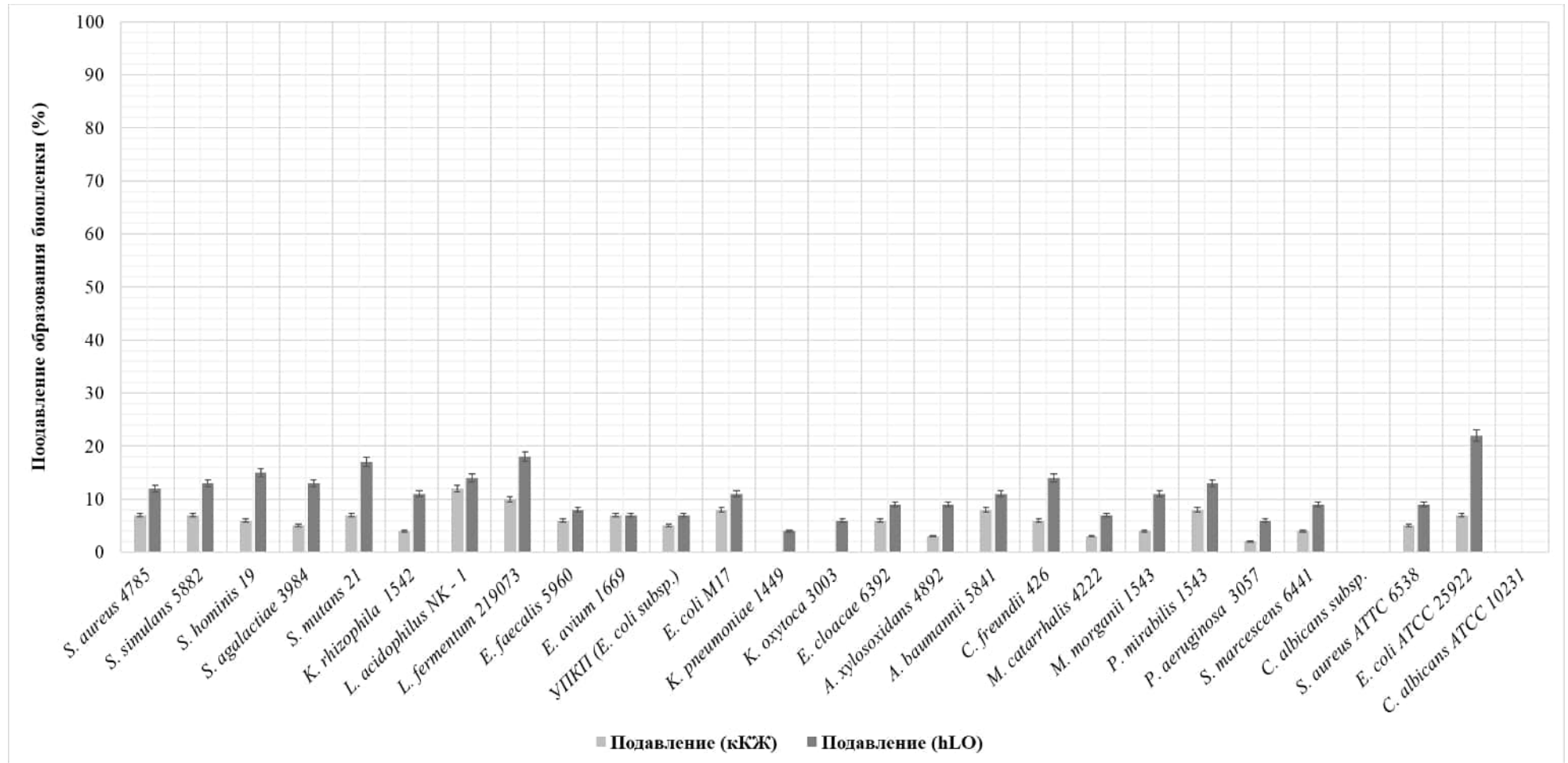


Рисунок 33 – Эффективность подавления биопленкообразования при внесении кКЖ и hLO *T. harzianum* Rifai F-180 в питательную среду на этапе 48-ми часового культивирования

5. 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ ПРИ ПОМОЩИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ (СЭМ)

Воздействие LO на формирование биоплёнок 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 34) и *E. faecalis* (Рисунок 35). 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* (Рисунок 36) установлено уменьшение продукции межклеточного матрикса, полностью закрывающего бактерии в контрольных образцах. На поверхности отдельных бактерий отмечена «зернистость».

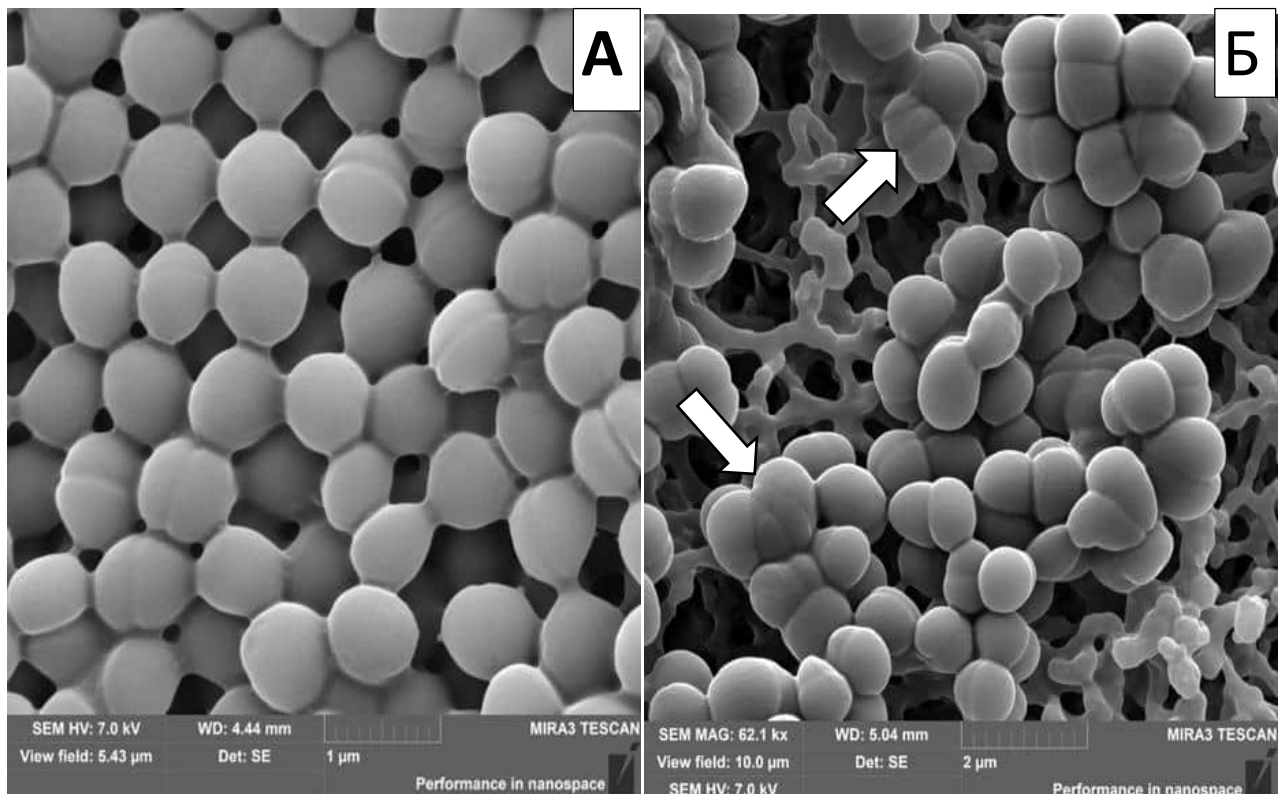


Рисунок 34 – Фрагменты биопленки *S. aureus* (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия) (Увеличение: А – 100.0 кх, Б – 62.1 кх, В – 62.3 кх, Г – 12.5 кх, Д – 24.9 кх, Е – 24.9 кх)

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

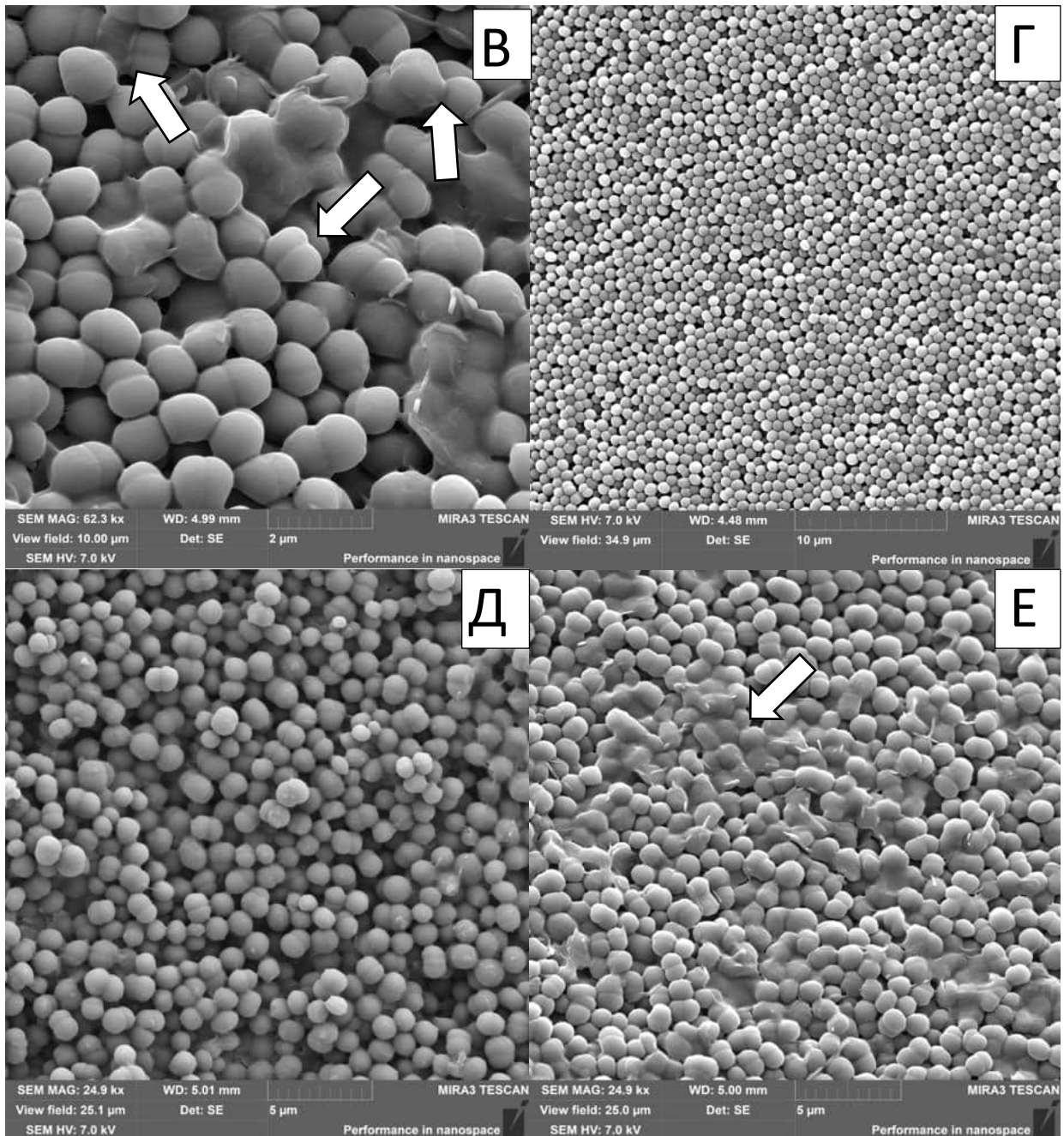


Рисунок 34 (продолжение) – Фрагменты биопленки *S. aureus*. (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия) (Увеличение: А – 100.0 кх, Б – 62.1 кх, В – 62.3 кх, Г – 12.5 кх, Д – 24.9 кх, Е – 24.9 кх)

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

На рисунке 34 (Б, Д) продемонстрирована повышенная продукция межклеточного матрикса под действием кКЖ в сравнении с контролем (АГ). Также были визуализированы дефекты деления клеток (неполностью разделенные клетки, нетипичная форма клетки) и клеточных стенок (ВЕ) *S. aureus* под воздействием LO.

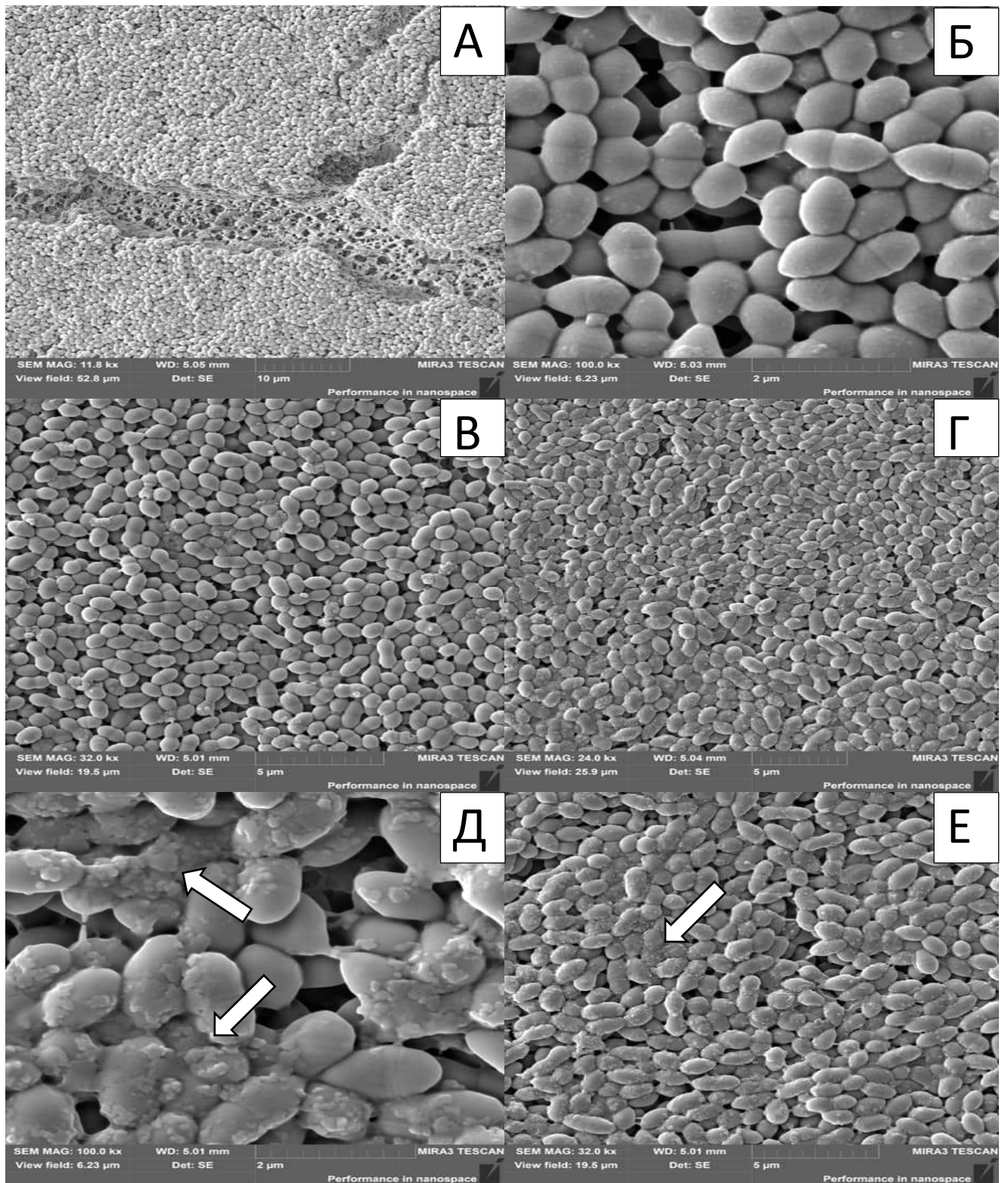


Рисунок 35 – Фрагменты био пленки *E. faecalis* (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия. Увеличение: А – 11.8 кх, Б – 100.0 кх, В – 32.0 кх, Г – 24.0 кх, Д – 100.0 кх, Ж – 12.5 кх, З – 50.0 кх, И – 16.0 кх)

Примечание: А, Б, В - контроль; Г, Д, Е – воздействие кКЖ, стимулирует образование на поверхности *E. faecalis* аморфных хлопьевидных масс (Д, Е); Ж, З, И – воздействие hLO. В единичных случаях выявлены нарушения деления клеток, отмечено появление сочленений в местах расхождения делящихся бактерий (З)

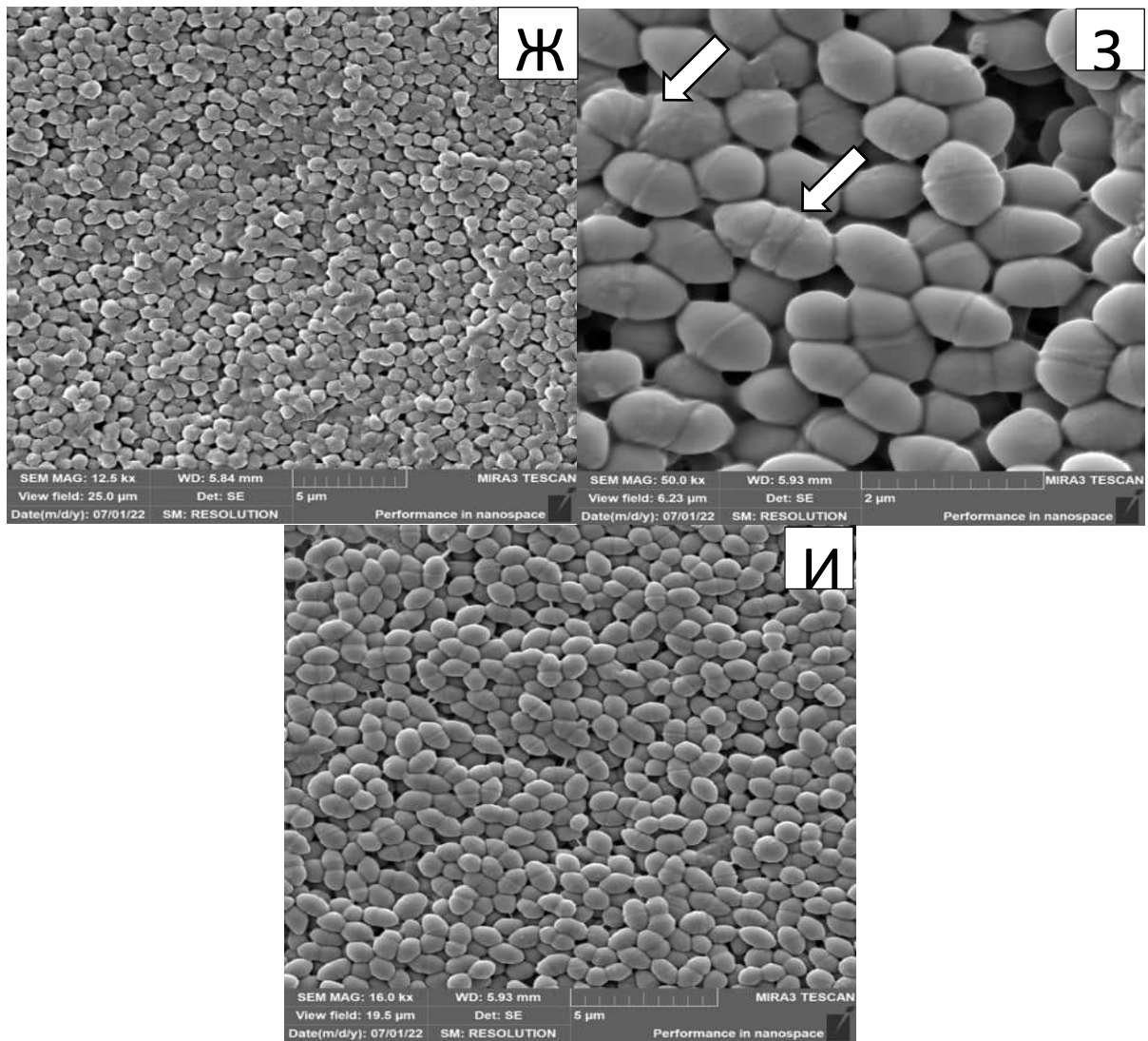


Рисунок 35 (продолжение) – Фрагменты биопленки *E. faecalis* (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия. Увеличение: А – 11.8 кх, Б – 100.0 кх, В – 32.0 кх, Г – 24.0 кх, Д – 100.0 кх, Ж – 12.5 кх, З – 50.0 кх, И – 16.0 кх)

Примечание: А, Б, В - контроль; Г, Д, Е – воздействие кКЖ, стимулирует образование на поверхности *E. faecalis* аморфных хлопьевидных масс (Д, Е); Ж, З, И – воздействие hLO. В единичных случаях выявлены нарушения деления клеток, отмечено появление сочленений в местах расхождения делящихся бактерий (З)

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 35 Г, Д, Е, Ж, З, И).

Установлено, что в глубоких слоях биопленки *E. faecalis* часть популяции бактерий имеют округлую форму, бактерии попарно соединены

плотными образованиями, длина которых превышает суммарный диаметр объединенных бактерий (Рисунок 36).

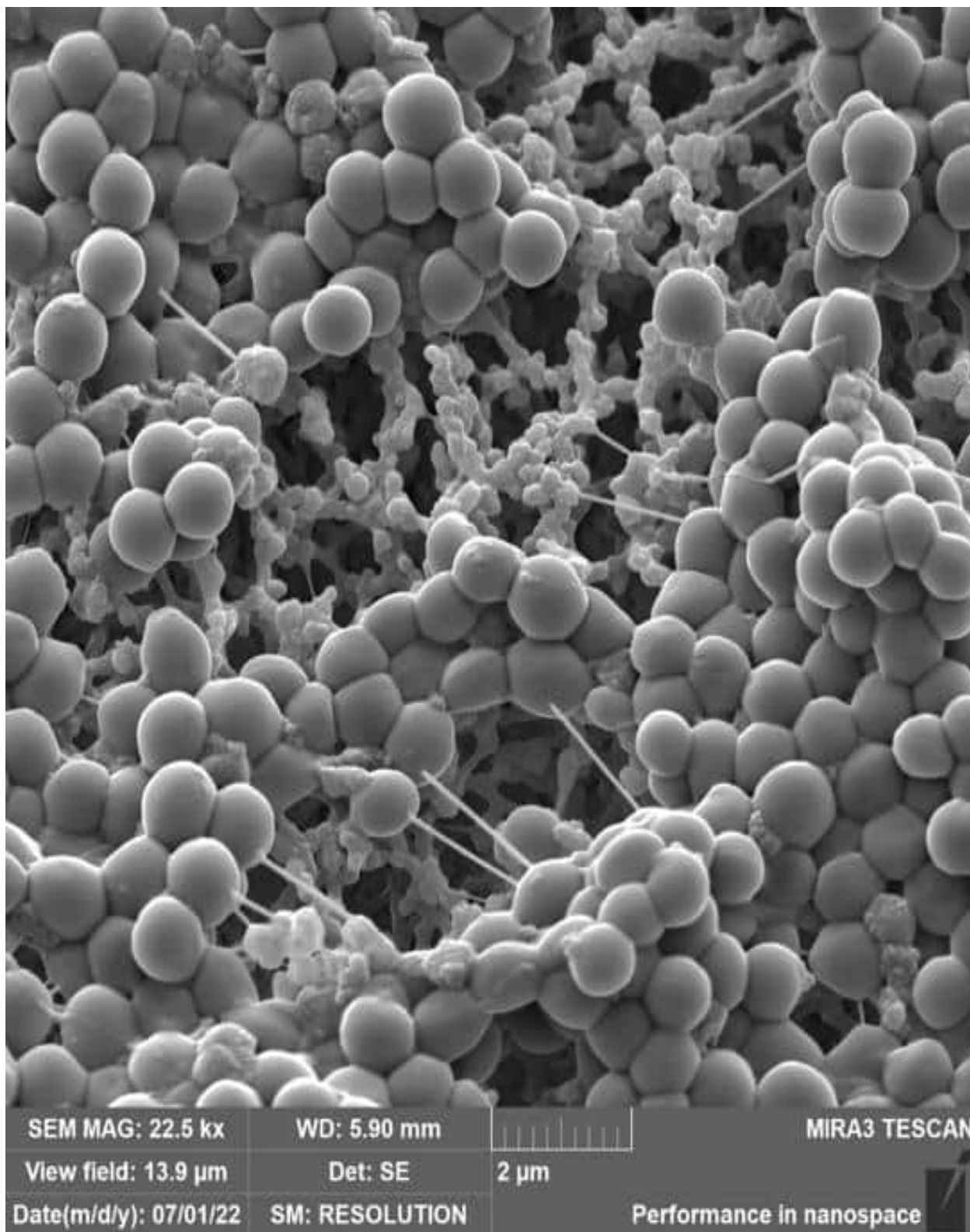


Рисунок 36 – Электронная фотография глубинной структуры биопленки *E. faecalis* (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия. Увеличение: 22.5 кx)

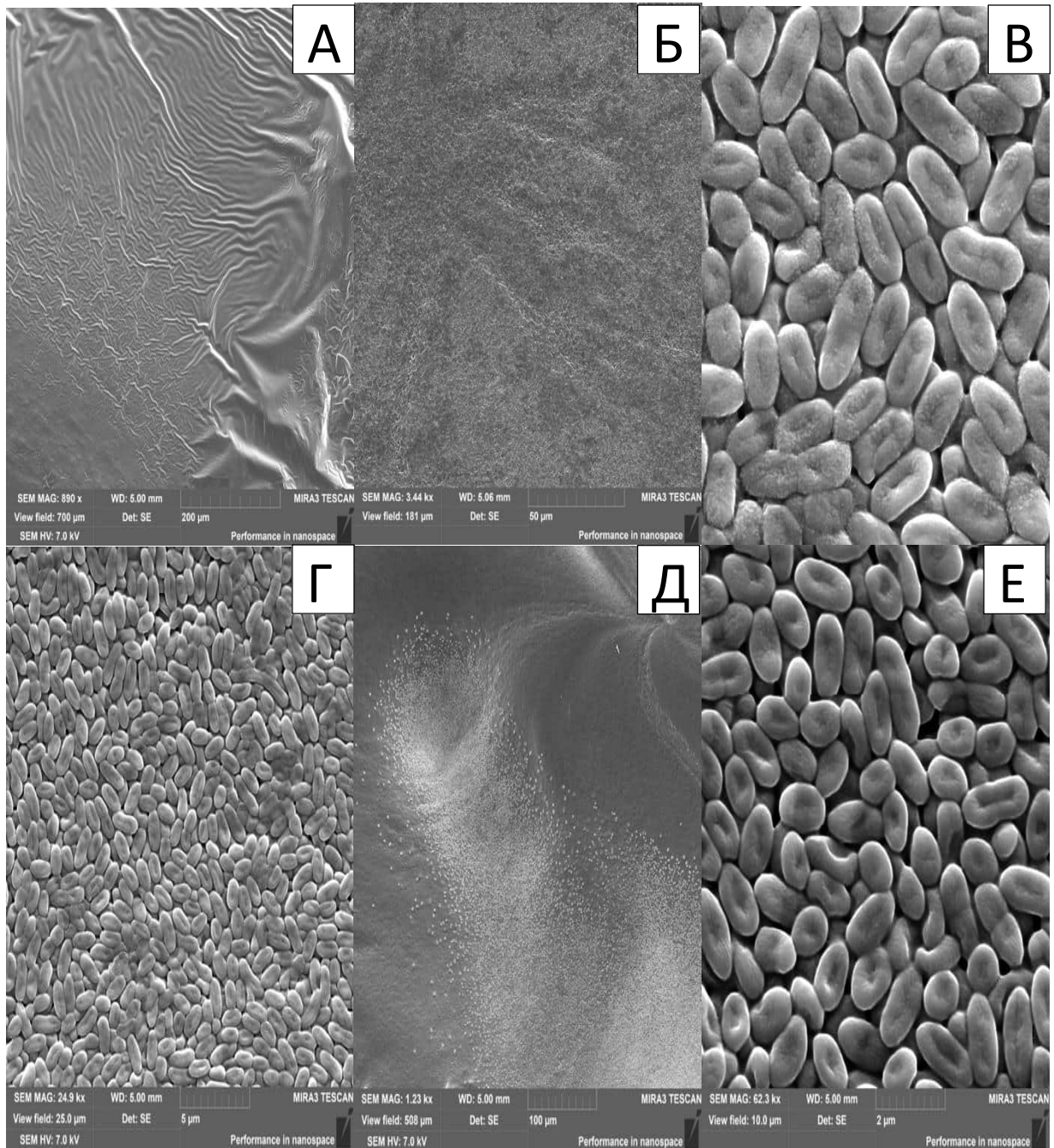


Рисунок 37 – Фрагменты биопленки *K. pneumoniae* (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия. Увеличение: А – 890 х, Б – 62.3 кх, В – 1.23 кх, Г – 24.9 кх, Д – 50.0 кх, Е – 3.44 кх)

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

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 37).

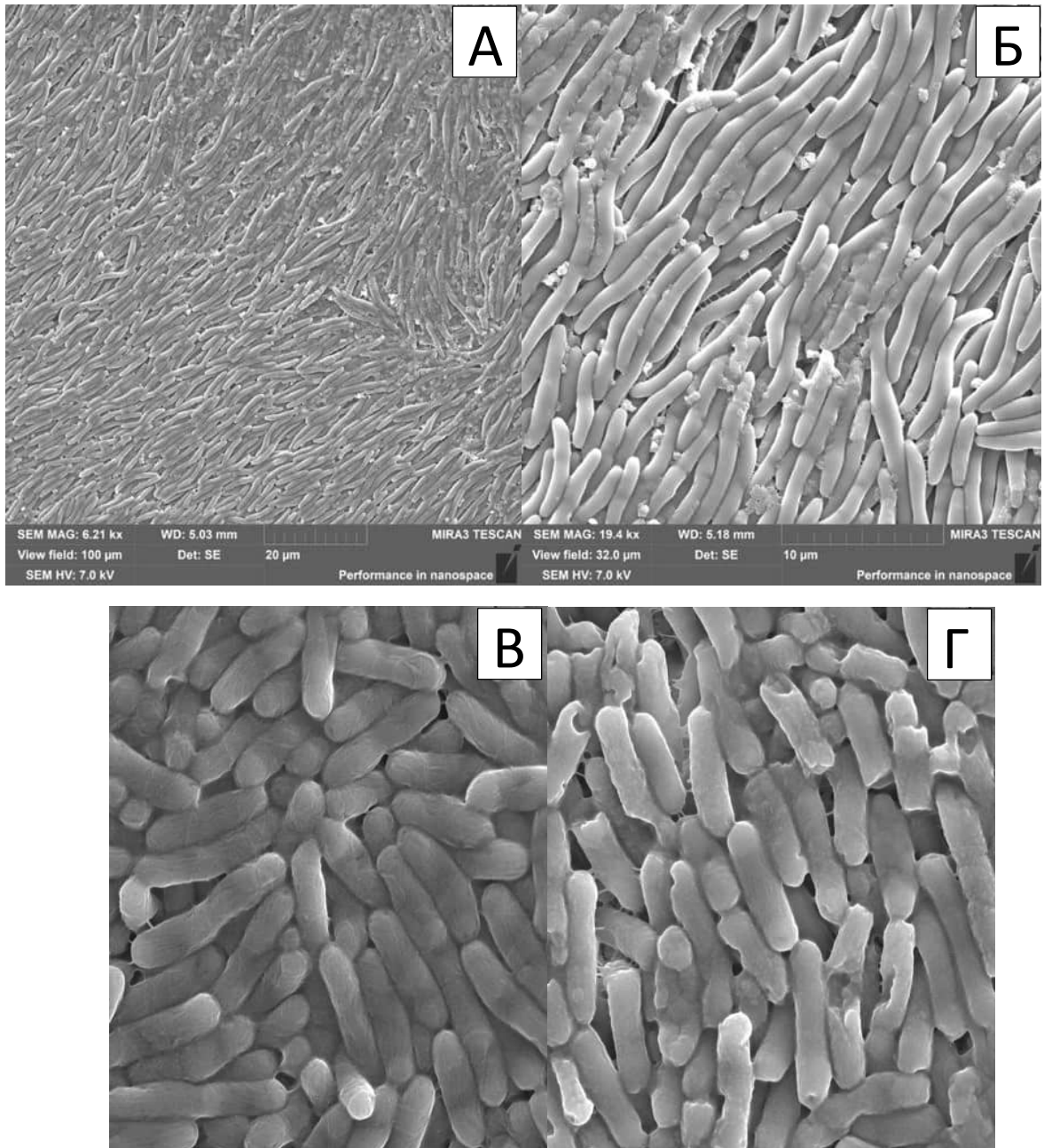


Рисунок 38 – Фрагменты биопленки *P. aeruginosa* (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия)

Примечание: А, Б – контроль; Д - воздействие кКЖ; Г – воздействие hLO. (Увеличение: А – 19.4 кх, Б – 6.21 кх, В – 50.0 кх, Г – 50.0 кх)

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 38). После воздействия hLO на большом поле обзора видно, что *P. aeruginosa* расположены цепочкой под общей капсулой, под которой различимы очертания бактерий, что подтверждено различной восприимчивостью к окраске (Рисунок 39).

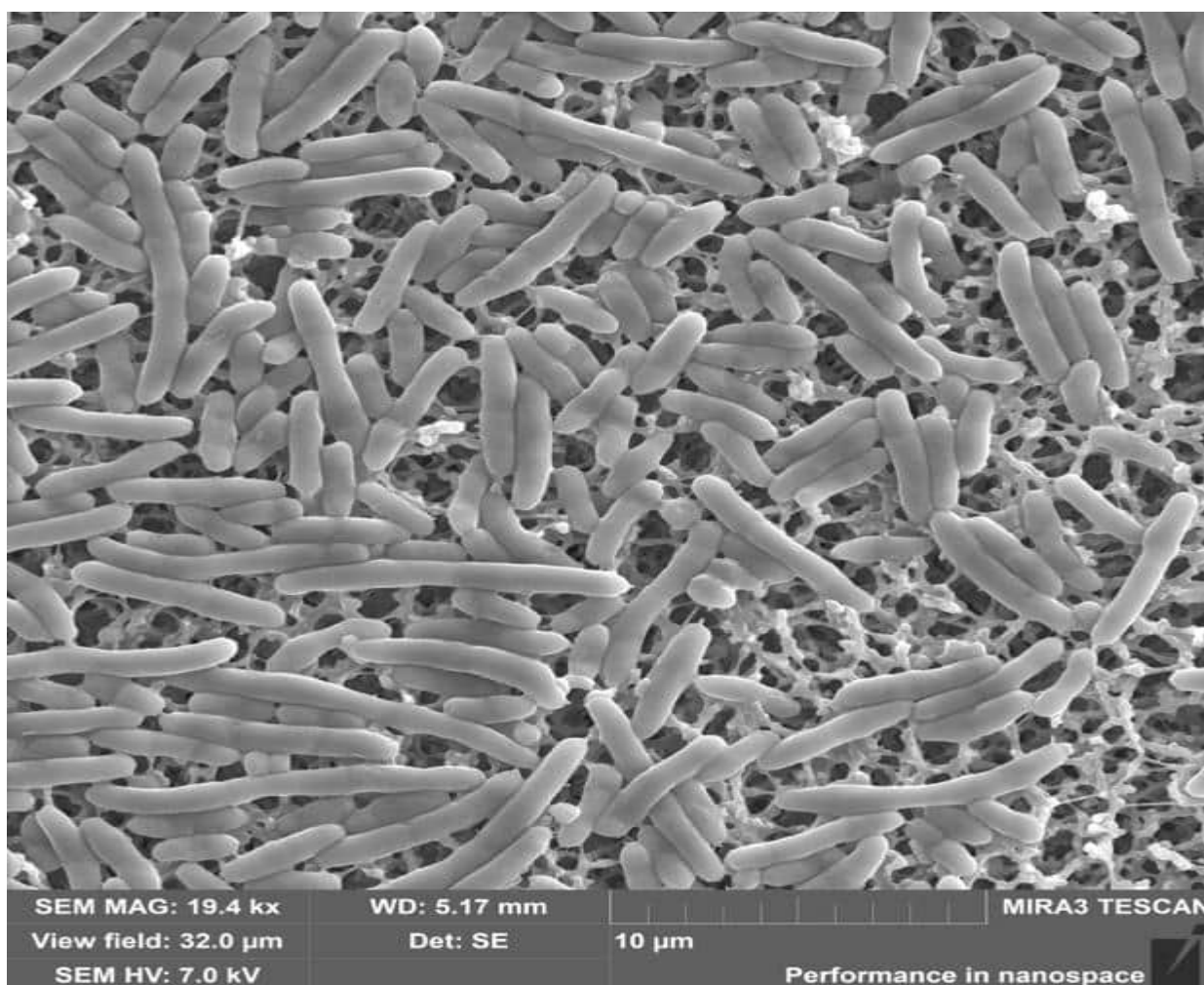


Рисунок 39 – Фрагменты биопленки *P. aeruginosa* (единичные *P. aeruginosa*) под воздействием hLO (сканирующий электронный микроскоп Mira «Tescan», Чехия. Увеличение 19.4 кх)

На данном этапе исследования с помощью 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.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЭУКАРИОТИЧЕСКИМ КЛЕТКАМ

С целью дальнейшего теоретического использования LO в качестве противомикробного препарата необходимо было определить наличие или отсутствие цитотоксичности у данного вещества. Цитотоксичность исследовали на культуре клеток Vero E6.

Исследуемый фермент LO не проявляет цитотоксического действие по отношению к культуре эукариотических клеток Vero E6 в концентрации $6 \cdot 10^3$ кл/лунку (объем среды 100 мкл среды), как видно из полученных результатов, представленных в таблице 12.

Таблица 12 – Определение цитотоксического действия hLO на культуре клеток Vero E6

	Тестовые лунки				Концентрация фермента (мкг/мл)	Контроль клеток			
	1	2	3	4		5	6	7	8
A	0	0	0	0	640	0	0	0	0
B	0	0	0	0	320	0	0	0	0
C	0	0	0	0	160	0	0	0	0
D	0	0	0	0	80	0	0	0	0
E	0	0	0	0	40	0	0	0	0
F	0	0	0	0	20	0	0	0	0
G	0	0	0	0	10	0	0	0	0
H	0	0	0	0	5	0	0	0	0

Примечание. Оценку вирусной продукции по цитопатическому действию – лизис клеток (ЦПД) осуществляли на основе анализа жизнеспособности клеток при помощи фазово-контрастной микроскопии, с окрашиванием 1% водным раствором трипанового синего. Степень ЦПД оценивали по 4-х крестовой системе: 0 – нет видимого ЦПД, + – визуализируются 1 – 2 очага ЦПД, масштабом не более 20% от клеточного монослоя, ++, +++ - наблюдается ЦПД 20% - 75% клеточного монослоя клеток, ++++ - 100% полный лизис клеточного монослоя

На данном этапе исследование было показано отсутствие цитотоксического действия hLO по отношению к клеточной линии Vero E6.

ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

7.1. РАЗРАБОТКА СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ЭКСПРЕСС МЕТОДА КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

После апробации экспресс определения активности и наличия фермента, одной из целей исследования стала разработка более простого и ускоренного метода на основе иммунной реакции. За основу был взят экспресс метод серологической идентификация дисперсных антигенов – кольцепреципитация и преципитация в агаре.

Для разработки метода и изучения иммунологических свойств фермента необходимо было получить иммунную сыворотку к самому ферменту. В качестве пробной биологической модели был выбран кролик породы «советская шиншилла» в количестве 3 животных возрастом 80 – 85 дней массой 2,5 – 3 кг. После получения животных они находились в изоляции 2 недели в карантинном блоке вивария Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы (04.02.2021 – 18.02.2021) с ежедневным измерением температуры и массы тела один раз в сутки. Питание (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.

Биологическая модель была выбрана в связи с простотой содержания и относительно большими размерами животных, что позволяет произвести забор относительно большого объема крови, в сравнении с мышами, крысами или морскими свинками.

Перед введением антигена производился забор крови объемом 1 мл для получения контрольной сыворотки.

Кролики были разделены на 3 группы согласно дизайну эксперимента:

1. При первичном введении одному кролику раствор hLO вводили в составе 0,5 мл полного адьюванта Фрейна (*) с добавлением 0,5 мл 0,9% раствора NaCl (соотношение 1:1). Введение проводилось по следующей схеме: холка – 0,5 мл суспензии, плечо и бедро (оба) по 0,1 мл, п/к.
2. Второму вводили раствор hLO в 1 мл 0,9% раствора NaCl. Введение производилось в краевую вену уха.
3. И третьему кролику вводили 1 мл 0,9% раствора NaCl. Введение производилось в краевую вену уха.

Вторично введение проводилось по единой схеме и внутривенно в краевую вену уха. Для иммунизации кроликов была выбрана следующая схема введения антигена на 1, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 24 сутки.

После проведенной полного цикла иммунизации из краевой вены уха, в дневное время суток, была забрана кровь объемом 5 мл от каждого из роликов, для получения сыворотки.

Сыворотку получали путем постановки крови в термостат на 1 час при температуре 37с, после образования сгустка, стеклянной палочкой его отделили от краев пробирки типа эппендорфа ($V = 5$ мл) и в последующем центрифугировали в течение 10 минут 2,4 грм. Далее сыворотка забиралась дозатором и переносилась в стерильную пробирку типа эппендорф ($V = 5$ мл) с последующим использованием в реакции преципитации.

Для постановки реакции преципитации в преципитационные пробирки объемом 400 мкл вносили 200 мкл иммунной кроличьей сыворотки и 200 мкл раствора hLO, растворенного в физиологическом растворе с конечной концентрацией 0,1 мг/мл. Помимо реакции кольце – преципитации, производили реакцию в геле. С этой целью готовили раствор 1% агарозный гель. В расплавленном состоянии гель наносился на стандартное предметное стекло в объеме 1 мл. Затем стерильным пробойником изготавливались лунки ($D = 5$ мм, $V = 15$ мкл). В лунку O1– вносили иммунную сыворотку, полученную в ходе эксперимента. В лунку К – вносили нормальную цитратную кроличью сыворотку. В лунку O2 – вносили раствор hLO в

физиологическом растворе с конечной концентрацией 0,1 мг/мл. Все образцы вносились объёмом 15 мкл.

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, так как в схожих работах использовались данные животные модели, и в связи со стандартизацией для этих лабораторных животных протоколов исследований и относительной простотой содержания.

Исследование иммунологических свойств LO проводили следующим образом. hLO вводили мышам линии С₅₇В1 внутривенно пятикратно в дозе 35 ЕД/кг. Ежеженедельно 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 изучены 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). АИ представляет собой отношение между животными, у которых были проявления шока к общему количеству животных, используемых в эксперименте. При этом в индексе учитывается степень выраженности шока в баллах: 4 балла соответствовали гибели животного, 3 балла - тяжелый шок, 2 балла шок средней степени тяжести, 1 балл - шок слабой степени выраженности, 0 баллов - отсутствие шока.

Вычисление анафилактического индекса.
$$АИ = \frac{(ax4) + (bx3) + (vx2) + (rx1) + (dx0)}{a + b + v + r + d}$$
, где a – число животных, с шоком на 4 балла; b – число животных с шоком 3 балла; v – число животных с шоком 2 балла; r – число животных с шоком 1 балл; d – число животных без шока.

Для изучения активной кожной анафилаксии использовалась та же биологическая модель, морские свинки. Сенсибилизацию 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. Кожные пробы ставили методом алергометрического тестирования на 21-е сутки. 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). ИНР считался положительным при визуализации кожной реакции по описанным ранее критериям. Определения индекса наличия реакции (ИНР)

$$\text{ИНР} = \frac{a}{b} - \frac{в}{г} / х \cdot 100$$
, где, a – число животных с положительными реакциями в опытной группе; b – общее число животных в опытной группе; $в$ – число животных с положительными реакциями в контрольной группе; $г$ – 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.

7. 2. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ НА МЫШАХ В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И В УСЛОВИЯХ *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 (Таблица 13).

Таблица 13 – Титр антител к LO, у группы мышей, иммунизированных hLo

Линия мышей	День анализа	Титр антител
C57Bl	1	0
	7	1/64
	14	1/16-32
	21	1/8
	28	0
	35	0

В последующие сроки у мышей титр антител снижался до показателей, которые не поддавались определению.

7. 3. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ НА МОРСКИХ СВИНКАХ В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Для изучения иммунологической активности первичную сенсibilизацию 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 сенсibilизацию организма животных. Ни в одном случае не были зарегистрированы сильные реакции со смертельным исходом. Слабая транзиторная аллергическая реакция, отмеченная у части экспериментальных животных, свидетельствует о низкой сенсibilизирующей активности LO. Незначительные различия в проявлении аллергических реакций по группам с разными партиями кКЖ могут быть связаны с особенностями компонентного состава среды. Достоверных различий между группами выявить не удалось. При изучении

иммунологической активности hLO также не было выявлено заметных аллергических реакций несмотря на то, что сенсibilизирующая доза hLO по белку была несколько большей, чем у кКЖ (Таблица 14).

Исследования иммунологической активности кКЖ и hLO в перекрестных реакциях, когда сенсibilизировали hLO, а разрешающую дозу вводили кКЖ, не выявили сенсibilизации 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, а в ряде случаев даже слабее других ферментных препаратов, разрешенных к применению (солизим, сомиллаза, терридеказа, стрептодеказа и др.). Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Анафилактическая активность кКЖ и hLO

Форма фермента L-лизин- α -оксидазы	Число морских свинок в группе	Значение анафилактического индекса (АИ) $M \pm m$	p*- значение	Сенсibilизирующая доза	
				ЕД/кг	мг/кг
1. кКЖ	8	$0,8 \pm 0,3$ (4 - 1)	<0,05	35	0,77
2. кКЖ	10	$1,2 \pm 0,2$ (1 - 2)	<0,05	35	0,35
3. кКЖ	9	$1,0 \pm 0,3$ (1 - 3)	<0,05	35	0,41
4. кКЖ	8	$1,3 \pm 0,2$ (1 - 4)	<0,05	35	0,35
5. hLO	9	$1,0 \pm 0,3$ (1 - 5)	<0,05	35	1,09

Примечания: p* – уровень значимости приведен в сравнении с различными группами, указанными в скобках.

Таким образом, интенсивность иммунного ответа к hLO не превышает или даже несколько ниже других ферментных препаратов, разрешенных к применению.

7. 4. 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 15.

Таблица 15 – 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 15 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. Положительные реакции на введение больших доз тест-аллергенов наблюдали в группах интактных животных, не получавших фермент. Подобные реакции обусловлены неспецифическим действием фермента в месте инъекции. Одинаково слабые реакции по показателю наличия реакции (ИНР) отмечены у животных, сенсибилизированных как кКЖ, так и hLO, однако при введении hLO с малой дозой тест-аллергена – 10,0 мкг/мл – отмечена несколько большая реакция. Интенсивность кожных реакций (ИНР) у животных, получавших кКЖ и hLO

в испытанном диапазоне концентрации тест-аллергена, была достаточно слабой, однако значения этого показателя для hLO были несколько выше, чем для кКЖ, при использовании доз 50 и 10,0 мкг/мл.

Обобщая полученные результаты, можно сделать заключение о слабой кожносенсibiliзирующей активности ферментов. Статистически значимых различий между нативным модифицированным ферментом не выявлено. Полученные результаты, по-видимому, можно рассматривать как один из методов оценки сенсibilизации 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 16.

Таблица 16 – Сравнительная иммунологическая активность LO и других ферментных препаратов

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

Как видно из таблицы 16 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 кожносенсibiliзирующей и анафилктической активностью, сопоставимой с зарегистрированными медицинскими препаратами из группы ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первом этапе исследования была оптимизация культивирования продуцента *T. harzianum* Rifai F – 180 в лабораторных условиях, в связи со значительным расхождением данных в литературных источниках и производственных протоколах [3, 4, 17]. При лабораторном культивировании *T. harzianum* Rifai F – 180, было экспериментально установлено, что оптимальные температурные условия для синтеза фермента LO при температуре равной $+27,0 \pm 1,0$ °C. Был определен необходимый уровень pH среды, в значениях: 6,7 – 7,1, в атмосфере воздуха или при смешанном культивировании, с постоянным перемешиванием среды 80 – 120 rpm (об / мин). Продолжительность культивирования продуцента составляет от 5 до 12 дней. Максимальная концентрация LO в среде определяется на 11 – 12 сутки. При более длительном периоде культивирования наблюдается снижение концентрации LO.

Результаты первого этапа представляют большую практическую значимость для получения фермента в лабораторных условиях, при небольшом объеме среды, а также позволяют модифицировать и улучшить метод в медицинской микробиологии.

Одной из задач было изучение активности и концентрации LO в КЖ продуцента гриба рода *T. harzianum* Rifai F – 180. Для выполнения поставленной задачи был разработан метод экспресс определения активности LO, который основан на использовании тетраметилбензида (ТМБ). До этого в методе для оценки активности и количества LO в КЖ использовался орто-дианизидингидрохлорид (ОДГ), с установленным канцерогенным эффектом и требующим особой подготовки и квалификации оператора [21, 102]. Небезопасный ОДГ в цветной пробе был заменен на ТМБ, который показал более высокую чувствительность и биологическую безопасность.

Следующей задачей диссертационного исследования было изучить противомикробное действие метаболита продуцента плесневого гриба рода *T.*

harzianum Rifai F – 180 – LO и сравнить эффективность hLO с кКЖ, полученной в процессе ультрафильтрации на мембранах, после лабораторного культивирования.

В ходе проведенной работы было установлено, что hLO и кКЖ оказывают более выраженное действие в отношении грамположительных бактерий (от 17 мм до 24 мм – для hLO, от 9 мм до 16 мм для кКЖ, в сравнении с грамотрицательными бактериями и от 11 мм до 16 мм – для hLO, от 6 мм до 10 мм для кКЖ). Полученный результат может быть связан с отличительными особенностями строения клеточной стенки: наличие субстрата для фермента LO – аминокислоты L – лизина в полипептидных мостиках грамположительных бактерий (L – аланин – D – глутаминовая кислота – L – лизин – D – аланин) между полисахаридами N -ацетилмураминовой кислоты (NAM) и N-ацетилглюкозамина (NAG), в то время как у грамотрицательных бактерий L – лизин замещен на мезо – аминопимелиновую кислоту.

Вероятно, умеренный антибактериальный эффект LO в отношении грамотрицательных бактерий в модифицированном лунко-диффузионном методе Кирби-Бауэра может быть связан с тем, что объем внесенного раствора в лунки ограничен и концентрация фермента является недостаточной для получения выраженного эффекта. Этот вопрос требует дальнейшего изучения, поскольку проблема лечения заболеваний, вызванных полирезистентными УПКП, остается актуальной, а механизмы, способствующие формированию антибиотикорезистентности бактерий, развиваются.

Несмотря на умеренно выраженный антибактериальный эффект в отношении УПКП, была отмечена статистически значимая взаимосвязь индекса мультилекарственной резистентности (ИМЛР) и зоны задержки роста: чем выше ИМЛР у штамма УПКП, тем более выраженная зона задержки роста и, следовательно, чувствительность к изучаемому ферменту LO. Предположительно, полученные результаты связаны с ограничением размера генома прокариотической клетки и феноменом «вытеснения»; то есть, чем больше генов, обуславливающих устойчивость к антибиотикам, имеет

микроорганизм, тем более вероятно, что ген «домашнего хозяйства», который отвечает, например, за альтернативный путь синтеза L-лизина, будет вытеснен, подобные закономерности уже были описаны в других исследованиях для других субстанций и антибиотиков [12].

Полученные результаты являются важными и актуальными даже несмотря на то, что ранее в научной литературе уже сообщалось о наличии антибактериальной активности LO, но в качестве тестируемых микроорганизмов исследовались только фитопатогены [177], в то время как данные об эффективности в отношении микроорганизмов значимых для медицины отсутствовали.

Также была проведена оценка антагонистической активности фермента LO и КЖ продуцента *T. harzianum* Rifai по отношению к дрожжевым грибам *C. albicans*. В ходе этого эксперимента получены достоверные данные об отсутствии эффекта в отношении дрожжевых грибов рода *Candida*, что не сопоставляется с данными других исследований, указывающих на продукцию и наличие в культуральной жидкости противогрибковых субстанций [25, 86], однако при более детальном изучении данных работ, можно обнаружить, что эта активность актуальна в отношении возбудителей грибковых заболеваний растений.

Формирование биопленок играет важную роль в развитии хронических заболеваний и осложнений при эндопротезировании или катетеризации у пациентов [25, 86]. Образование биопленок – многоэтапный и сложный процесс, включающий переход бактерий из свободной планктонной формы в адгезивную форму, что является начальной стадией формирования биопленок. При этом важна разработка методов, направленных как на предотвращение образования биопленок, так и на разрушение уже образовавшихся [198].

Внесение hLO или кКЖ на ранней стадии культивирования бактериальной культуры существенно подавляло образование биопленок (91–100%). При этом результаты при введении hLO были равны 99–100%, а при введении Ккж – от 91 до 93%. При введении hLO или кКЖ в среду

культивирования на более поздних стадиях эксперимента, через 24 и 48 ч, ингибирование биопленкообразования было менее выраженным: 20–36% и 5–22% соответственно.

Теоретический механизм подавления биопленкообразования hLO заключается в том, что LO катализирует реакцию окислительного дезаминирования незаменимой аминокислоты L-лизина с образованием четырех продуктов реакции: α -кето- α -аминокапроновой кислоты, аммиака, δ -пиперидин-2-карбоновая кислота (которая может возвращаться в α -кето- α -аминокапроновую кислоту) и перекись водорода. Данный механизм действия был подробно описан в предыдущих исследованиях других исследователей [114].

У бактерий, например, *E. coli*, L-лизин синтезируется по диаминопимелатному пути и участвует в малонилировании белков. Следует отметить, что LO теоретически снижает биосинтез белка на рибосомах в бактериальных клетках в связи с конкурентным связыванием с внутри бактериальным L-лизином, участвующем в синтезе белка, что ведет к торможению синтеза белков на рибосомах, предположительно, именно этот процесс лежит в основе торможения образования биопленок, а именно ингибировании синтеза матричных белков, которые служат основой формирования биопленок или сигнальные молекулы, участвующих в кворум-сенсинге. Косвенно это предположение подтверждается выраженным снижением эффекта от введения hLO и кКЖ на более поздних стадиях формирования биопленок. Также из-за действия фермента, как было отмечено ранее, подавляется синтез клеточной стенки за счет разрушения L-лизина, входящего в состав последнего. С другой стороны, образующиеся в ходе реакции кислоты также теоретически обладают бактерицидным действием, однако в этом случае прогнозировать количество продуктов реакции, и как следствие их бактерицидный и бактериостатический эффекты, довольно сложно из-за множества неконтролируемых условий в ходе самого эксперимента. Не исключено, что образующаяся в ходе реакции перекись

водорода способна подавлять образование биопленок. При взаимодействии перекиси водорода с субстратом выделяются активные формы кислорода, которые повреждают клеточные мембраны. Это действие может лежать в основе ингибирования образования биопленок этим химическим веществом в других исследованиях [198]. Но вышеизложенная теория не являлась задачей диссертационного исследования и требует дальнейшего изучения.

По результатам исследований hLO оказывал несколько более выраженный эффект по сравнению с кКЖ, что может свидетельствовать о том, что ингибирующее действие на образование биопленок оказывал сам фермент в несколько более высокой концентрации, а не другой метаболит, образующийся в кКЖ. Однако разница в активности между hLO или кКЖ невелика, что теоретически показывает возможность использования как фермента, так и кКЖ для подавления образования биопленок. Следует отметить, что ингибирующий биопленкообразование эффект проявился при введении hLO или кКЖ в начале эксперимента, что позволяет предположить возможное использование фермента в качестве «защитного покрытия», предотвращающего образование биопленок на поверхности материалов, из которых изготовлены медицинские оборудование (катетеры, эндопротезы и др.).

В ходе диссертационного исследования была поставлена дополнительная задача - разработка серологической тест-системы для определения наличия и количества LO в культуральной жидкости. Изучение иммунологических свойств LO показало, что из-за его низкой иммуногенности нет возможности в полной мере произвести иммунизацию животных с последующим получением сыворотки для разработки серологического метода. Из полученных данных следует вывод о потенциально низком риске развития некоторых побочных эффектов при теоретическом применении LO в медицине. Например, покрытие ферментом эндопротезов, для предотвращения формирования биопленок, не должно привести к значительной выработке антител со стороны организма пациента,

и как следствие к риску развития аутоиммунных реакций при повторном использовании LO. С другой стороны по данным литературы у LO была выявлена противоопухолевая активность [7, 9, 12], суммирую эти положения, можно заключить, что LO представляет собой перспективный компонент для лекарственных препаратов, однако требующий дальнейшего изучения и апробации.

Изученные иммунологические свойства и установленный анафилактический индекс LO на биологических моделях сравнимы с подобными характеристиками других, ранее зарегистрированных ферментативных препаратов, таких как Солизим, А-амилаза, Террилитин (анафилактический индекс составил $1,3 \pm 0,2$ против $1,2 \pm 0,3$ / $1,2 \pm 0,2$ у остальных). В связи с этим можно предположить, что препарат на основе фермента LO не будет вызывать развитие нежелательных побочных эффектов в виде аллергических реакций.

Таким образом, полученные результаты дают новые сведения об антибактериальной, биологической и иммунологической активности LO, продуцируемого почвенным сапрофитом *T. harzianum* Rifai F-180 и позволяют сделать заключение о широких перспективах использования данного фермента в практической медицине.

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 $+27,0 \pm 1,0$ °C; - 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 тетраметилбензидина, 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 множественно лекарственно-резистентных 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 СОКРАЩЕНИЙ

- БЛРС - Бета – лактамазы расширенного спектра
- ВИЗР- Всероссийский Институт Защиты Растений
- ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
- КЖ - культуральная жидкость
- кКж - концентрат культуральной жидкости
- ЛО / LO - L-лизин- α -оксидаза
- МЛУ - множественная лекарственная устойчивость
- ММ - маркер молекулярной массы
- МПА - мясо - пептонный агар
- МПБ - мясо – пептонный бульон
- ОДГ - орто-дианизидингидрохлорид
- ПААГ - полиакриамидный гель
- ПЛУ - полирезистентная лекарственная устойчивость
- СА - агар Сабуро
- СССР - Союз Советских Социалистических Республик
- СЭМ - сканирующая электронная микроскопия
- ТМБ - тетраметилбензидин
- УПКП / UPEC - уропатогенная *Escherichia coli* (уропатогенная кишечная палочка)
- ХС - хромогенная смесь
- ЦФБ - цитратно – фосфатный буфер
- ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
- hLO – гомогенный фермент L-лизин- α -оксидаза
- FDA - Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- НСТ 116 - клеточная линия колоректальной карциномы человека
- kDa - кило Дальтоны
- LS174T - клеточная линия карциномы толстого кишечника человека

mA - мили Амперы

MRSA - метициллинрезистентный золотистый стафилококк (*S. aureus*)

NCBI - National Centre for Biotechnology Information

SDS - sodium dodecyl sulfate

SPEV - клеточная линия почки эмбриона свиньи

spp. - виды (лат. «species»)

T47D - клеточная линия рака молочной железы

Vero - клеточная линия почки эмбриона зеленой мартышки

VRSA - ванкомицинрезистентный золотистый стафилококк (*S. aureus*)

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимова, Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф. К. Алимова. - 2006. - 268 с.
2. Арсенюк, А. Ю. Исследование процесса L-трансформации в популяции сальмонелл методами электронной и лазерной интерференционной микроскопии / А. Ю. Арсенюк, И. Б. Павлова, П. С. Игнатъев П. С. //Сельскохозяйственная биология. – 2013. – №. 6. – С. 55-60.
3. Биотехнология фермента L-лизин- α -оксидазы из триходермы / Смирнова И. П., Березов Т. Т. / М.: 2014. - 190 с.
4. Коломбет, Л.В. Грибы рода *Trichoderma* – продуценты биопрепаратов для растениеводства / Л. В. Коломбет // Успехи медицинской микологии. - 2007. - Т. 1. - С. 323-371.
5. Коломбет, Л.В. Экспресс-оценка антигрибного, рострегулирующего и фитотоксического действия протравителей семян / Л.В. Коломбет, М. С Соколов // Агрехимия. - 2006. - № 8. - С. 52-56.
6. Литовка, Ю.А. Скрининг Сибирских штаммов гриба рода *Trichoderma* – продуцентов биофунгицида на растительных субстратах / Ю.А. Литовка // Хвойные бореальные зоны. – 2018. – Т. 36, №6. – С.574-580.
7. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Приложение // Защита и карантин растений. – М.: 2013. - №4. - С. 636.
8. Сычев, П. А. Антагонистические свойства *Trichoderma viride* Fr. по отношению к некоторым патогенам *Cucumis sativum* L / П.А. Сычев, Ю.А. Шапошник // Микология и фитопатология. - 1982. - Т. 16, Вып. 2. - С. 151-159.
9. Штерншис, М. В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России / М.В. Штерншис // Вестник Томского Государственного университета. Биология. – 2012. – Т.18, №2. - С. 92 – 100.

10. Штерншис, М. В. Энтомопатогены – основа биопрепаратов для контроля численности фитофагов / Новосибир.: 2010. – 160 с.
11. Adivitiya, Y. P. The evolution of recombinant thrombolytics: Current status and future directions / Adivitiya, Y. P. Khasa // *Bioengineered*. - 2016. - Vol. 8, № 4. — P. 331-358.
12. Ait-Lahsen, H. An Antifungal Exo- α -1,3-Glucanase (AGN13.1) from the Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* / H. Ait-Lahsen, A. Soler, M. Rey, J. de la Cruz, E. Monte, A. Llobell // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2001. - Vol. 67, № 12. - P. 5833-5839.
13. Amano, M. Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine-oxidase from *Trichoderma viride* / M. Amano, H. Mizuguchi, T. Sano, H. Kondo, K. Shinyashiki, J. Inagaki, K. Inagaki // *Journal of Biochemistry*. - 2015. - Vol. 157, № 6. - P. 549-559.
14. Anand, U. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery / U. Anand, N. Jacobo-Herrera, A. Altemimi, N. Lakhssassi // *Metabolites*. - 2019. - Vol. 9, № 11. — P. 258.
15. Anand, U. A. Review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from *Apocynaceae* family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms / U. Anand, S. Nandy, A. Mundhra, N. Das, D.K. Pandey, A. Dey // *Drug Resistance Updates*. - 2020. - Vol. 51. — P. 100695.
16. Andrade, J. P. Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil / J. P. Andrade, A. S. D. R. Bispo, P. A. S. Marbach, R. P. do Nascimento // *Enzyme Research*. - 2011. - Vol. 2011, №1. - P. 167248
17. Antal, Z. Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species / Z. Antal, L. Manczinger, G. Szakacs, R. P. Tengerdy, L. Ferenczy // *Mycological Research*. - 2000. - Vol. 104, № 5. - P. 545-549.

18. Aslam, B. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook / B. Aslam, M. Khurshid, M. I. Arshad, S. Muzammil, M. Rasool, N. Yasmeen, Z. Baloch // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. - 2021. - Vol. 11. - P. 771510.
19. Avni-Nachman S. Short versus prolonged antibiotic treatment for complicated urinary tract infection after kidney transplantation / S. Avni-Nachman, D. Yahav, E. Neshet, B. Rozen-Zvi, R. Rahamimov, E. Mor, H. Green // *Transplant International*. - 2021. - Vol. 34, № 12. — P. 2686-2695.
20. Bal, U. A positive side effect from *Trichoderma harzianum*, the biological control agent: increased yield in vegetable crops / U. Bal, S. Altintas // *Journal of Environmental Protection and Ecology* - 2006. - Vol. 7, № 2. - P. 383-387.
21. Balouiri, M. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review / M. Balouiri, M. Sadiki, S. K. Ibnsou da // *Journal of pharmaceutical analysis*. - 2016. - Vol. 6. - № 2. - P. 71-79.
22. Bazargani, M. M. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms / M. M. Bazargani, J. Rohloff // *Food Control*. - 2016. - Vol. 61. - P. 156-164.
23. Bellamy, D. W. Some Properties of Penicillin-resistant *Staphylococci* / D. W. Bellamy, J. W. Klimek // *Journal of Bacteriology*. - 1948. - Vol. 55, № 2. - P. 153-160.
24. Bengtsson-Palme, J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance / J. Bengtsson-Palme, E. Kristiansson, D. J. Larsson // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2018. — Vol. 42, № 1. - P. fux053.
25. Benítez, T. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi / T. Benítez, J. Delgado-Jarana, A. Rincón, M. Rey, M. C. Limón, // *Europe*. - 1998. - Vol. 71, № 798. - P. 0-47.
26. Bhattacharyya, K. Correlation of drug resistance with single nucleotide variations through genome analysis and experimental validation in a multi-drug resistant clinical isolate of *M. tuberculosis* / K. Bhattacharyya, V.

- Nemaysh, M. Joon, R. Pratap, M. Varma-Basil, M. Bose, V. Brahmachari // BMC Microbiology. - 2020. - Vol. 20. - P. 1-14.
27. Bissett, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* and species formerly assigned to *Trichoderma* / J. Bissett // Canadian Journal of Botany. - 1991. - Vol. 69, № 11. - P. 2373–2417.
28. Bissett, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Section *Pachybasium*. / J. Bissett // Canadian Journal of Botany. - 1991. - Vol. 69, № 11. - P. 2418–2442.
29. Bissett, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Trichoderma* and the *Hypocrea teleomorphs* / J. Bissett // Canadian Journal of Botany. - 1991. - Vol. 69. - № 11. - P. 2443–2452.
30. Blesa, A. Noncanonical Cell-to-Cell DNA Transfer in *Thermus* spp. Is Insensitive to Argonaute-Mediated Interference / A. Blesa, C. E. César, B. Averhoff, J. Berenguer // Journal of Bacteriology. - 2015. - Vol. 197, № 1. - P. 138-146.
31. Blesa, A. The transjugation machinery of *Thermus thermophilus*: Identification of TdtA, an ATPase involved in DNA donation / A. Blesa, I. Baquedano, N. G. Quintáns, C. P. Mata, J. R. Castón, J. Berenguer // PLOS Genetics. — 2017. — Vol. 13, № 3. — P. e1006669.
32. Bolar, J. P. Expression of Endochitinase from *Trichoderma harzianum* in Transgenic Apple Increases Resistance to Apple Scab and Reduces Vigor / J. P. Bolar, J. L. Norelli, K. Wong, C. K. Hayes, G. E. Harman, H. S. Aldwinckle // Phytopathology. - 2000. - Vol. 90, № 1. — P. 72-77.
33. Boyle-Vavra, S. Molecular Strategies of *Staphylococcus aureus* for Resisting Antibiotics / S. Boyle-Vavra, R. S. Daum // *Staphylococcus: Genetics and Physiology*. — 2016. — P. 249-300.
34. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding/ M. M. Bradford // Analytical biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – №. 1-2. – P. 248-254.

35. Braithwaite, M. *Trichoderma* down under: species diversity and occurrence of *Trichoderma* in New Zealand / M. Braithwaite, P. R. Johnston, S. L. Ball, F. Nourozi, A. J. Hay, P. Shoukouhi, J. Bissett // Australasian Plant Pathology. - 2017. - Vol. 46. - P. 11-30.
36. Breijyeh, Z. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It / Z. Breijyeh, B. Jubeh, R. Karaman // Molecules. - 2020. - Vol. 25, № 6. - P. 1340.
37. Cao, J. Versatile and on-demand biologics co-production in yeast / J. Cao, P. Perez-Pinera, K. Lowenhaupt, M. R. Wu, O. Purcell, C. De La Fuente-Nunez, T. K. Lu // Nature Communications. — 2018. — Vol. 9, № 1. — P. 77
38. Carvalho, D. D. C. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum* / D. D. C. Carvalho, S. C.M.D. Mello, M. J. Lobo, A. M. Geraldine // Pesquisa Agropecuária Brasileira. - 2011. - Vol. 46, № 8. - P. 822-828.
39. Casciaro, B. Naturally-Occurring Alkaloids of Plant Origin as Potential Antimicrobials against Antibiotic-Resistant Infections / B. Casciaro, L. Mangiardi, F. Cappiello, I. Romeo, M.R. Loffredo, A. Iazzetti, D. Quaglio // Molecules. - 2020. - Vol. 25, № 16. - P. 3619.
40. Caspi, R. MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes / R. Caspi, H. Foerster, C. A. Fulcher, R. Hopkinson, J. Ingraham, P. Kaipa // Nucleic acids research. - 2006. - Vol. 34, № 1. - P. 511-516.
41. Chadha, S. Genome-wide analysis of cytochrome P450s of *Trichoderma* spp.: annotation and evolutionary relationships / S. Chadha, S. T. Mehetre, R. Bansal, A. Kuo, A. Aerts, I. V. Grigoriev, P. K. Mukherjee // Fungal Biology and Biotechnology. - 2018. - Vol. 5. — P. 1-15.
42. Chang, S. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene / S. Chang, D. M. Sievert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, F. P. Downes, S. K. Fridkin // New England Journal of Medicine. - 2003. - Vol. 348, №14. — P. 1342-1347.

- 43.Chen, R. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Escherichia coli* from urinary tract infections in Shandong, China / R. Chen, G. Wang, Q. Wang, M. Zhang, Y. Wang, Z. Wan, Y. Hao // International Microbiology. - 2023. - Vol. 26, № 4. — P. 1157-1166.
- 44.Cheng, A. V. Signed, Sealed, Delivered: Conjugate and Prodrug Strategies as Targeted Delivery Vectors for Antibiotics / A. V. Cheng, W. M. Wuest // ACS Infectious Diseases. - 2019. - Vol. 5, № 6. - P. 816-828.
- 45.Chopra, B. Synthesis and Characterization of Piperine Analogs as Potent *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors / B. Chopra, K. A. Dhingra, K. L. Dhar // Chem. Methodol. - 2019. - Vol. 3, № 1. - P. 104–114.
- 46.Coenye, T. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation/ T. Coenye, H. J. Nelis //Journal of microbiological methods. – 2010. – Vol. 83. – №. 2. – P. 89-105.
- 47.Cui, J. *Trichoderma* A–C, cadinane sesquiterpenes from a marine sponge symbiotic *Trichoderma* sp. SM16 fungus / J. Cui, R. Shang, M. Sun, Y. X. Li, H. Y. Liu, H. W. Lin, W. H. Jiao // Chemistry & Biodiversity. - 2020. - Vol. 17, № 4. – P. e2000036.
- 48.da Silva, F. A. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications /A. F. da Silva, I. M. Banat, A. J. Giachini, D. Robl // Bioprocess and Biosystems Engineering. - 2021. - Vol. 44, № 10. - P. 2003-2034.
- 49.Da Silva, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications / R. R. Da Silva // Applied Biochemistry and Biotechnology. - 2017. - Vol. 183. - P. 1-19.
- 50.Das, R. An antioxidant rich novel β -amylase from peanuts (*Arachis hypogaea*): Its purification, biochemical characterization and potential applications / R. Das, A. M. Kayastha // International Journal of Biological Macromolecules. - 2018. - Vol. 111. - P. 148-157.

51. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // *Microbiology and molecular biology reviews*. - 2010. - Vol. 74, № 3. - P. 417-433.
52. Degenkolb, T. Recent Advances and Future Prospects in Peptaibiotics, Hydrophobin, and Mycotoxin Research, and Their Importance for Chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea* / T. Degenkolb, H. Von Döhren, K. Fog Nielsen, G.J. Samuels, H. Brückner // *Chemistry & Biodiversity*. - 2008. - Vol. 5, № 5. - P. 671-680.
53. Dengler Haunreiter, V. In-host evolution of *Staphylococcus epidermidis* in a pacemaker-associated endocarditis resulting in increased antibiotic tolerance / V. H. Dengler, M. Boumasmoud, N. Häffner, D. Wipfli, N. Leimer, C. Rachmühl, A. S. Zinkernagel // *Nature Communications*. - 2019. - Vol. 10, №1. - P. 1149.
54. Deshmukh, S. K. Fungal endophytes: a potential source of antibacterial compounds / S. K. Deshmukh, L. Dufossé, H. Chhipa, S. Saxena, G. B. Mahajan, M. K. Gupta // *Journal of Fungi*. - 2022. - Vol. 8, № 2. - P. 164.
55. Dey, H. An integrated gene network analysis to decode the multi-drug resistance mechanism in *Klebsiella pneumoniae* / H. Dey, K. Vasudevan, K. R. Dasegowda, M. Rambabu, C. N. Prashantha // *Microbial Pathogenesis*. - 2022. - Vol. 173. - P. 105878.
56. Dordet-Frisoni, E. *Mycoplasma* chromosomal transfer: a distributive, conjugative process creating an infinite variety of mosaic genomes / E. Dordet-Frisoni, M. Faucher, E. Sagné, E. Baranowski, F. Tardy, L. X. Nouvel, C. Citti // *Frontiers in Microbiology*. - 2019. - Vol. 10. – P.2441.
57. Druzhinina, I. S. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts / I. S. Druzhinina, K. Chenthamara, J. Zhang, L. Atanasova, D. Yang, Y. Miao, C. P. Kubicek, I. V. Grigoriev, K. Barry // *PLoS genetics*. - 2018. - Vol. 14, № 4. - P. e1007322.

58. Druzhinina, I. S. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data / I. S. Druzhinina, A. G. Kopchinskiy, C. P. Kubicek // *Mycoscience*. – 2006. – Vol. 47. – №. 2. – P. 55-64.
59. du Plessis, I. L. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa, with five new additions / I. L. du Plessis, I. S. Druzhinina, L. Atanasova, O. Yarden, K. Jacobs // *Mycologia*. - 2018. - Vol. 110, № 3. — P. 559-583.
60. Du, F.Y. Sesquiterpenes and cyclodepsipeptides from marine-derived fungus *Trichoderma longibrachiatum* and their antagonistic activities against soil-borne pathogens / F.Y. Du, G.L., Ju, L. Xiao, Y.M. Zhou, X. Wu // *Marine Drugs*. - 2020. - Vol. 18, № 3. - P. 165.
61. Du, P. The role of plasmid and resistance gene acquisition in the emergence of ST23 multi-drug resistant, hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / P. Du, C. Liu, S. Fan, S. Baker, J. Guo // *Microbiology Spectrum*. - 2022. - Vol. 10, № 2. - P. e01929-21.
62. Elegbede, J. A. Fungal xylanases-mediated synthesis of silver nanoparticles for catalytic and biomedical applications / J. A. Elegbede, A. Lateef, M. A. Azeez, T. B. Asafa, T. A. Yekeen, I. C. Oladipo, E. B. Gueguim-Kana // *IET Nanobiotechnology*. - 2018. - Vol. 12, № 6. - P. 857-863.
63. Fadhil Abdul-Husin, I. Plasmid-Mediated Mechanism of Quinolone Resistance on *E. coli* Isolates from Different Clinical Samples / I. Fadhil Abdul-Husin, M. Sabri Abdul-Razzaq // *Archives of Razi Institute*. - 2021. - Vol. 76, № 3. - P. 561-573.
64. Fleming, A. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the *British Journal of Experimental Pathology* 10:226-236, 1929 / A. Fleming // *Rev. Infect. Dis.* - 1929. - Vol. 2, № 1. - P. 129-39.
65. Fraga, J. L. Palm oil wastes as feedstock for lipase production by *Yarrowia lipolytica* and biocatalyst application/reuse / J. L. Fraga, C.P. Souza, A.D.C.

- Pereira, E. C. de Silva, A. G. Torres, P. F. Amaral // 3 Biotech. - 2021. - Vol. 11, № 4. - P. 191.
66. Freeman, D. J. New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci* / D. J. Freeman, F. R. Falkiner, C. T. Keane // Journal of clinical pathology. – 1989. – Vol. 42. – №. 8. – P. 872-874.
67. Gao, R. The evolutionary and functional paradox of cerato-platanins in fungi / R. Gao, M. Ding, S. Jiang, Z. Zhao, K. Chenthamara, Q. Shen, I. S. Druzhinina // Applied and Environmental Microbiology. - 2020. - Vol. 86, № 13. - P. e00696-20.
68. Gao, T. Cross talk between calcium and reactive oxygen species regulates hyphal branching and ganoderic acid biosynthesis in *ganoderma lucidum* under copper stress / T. Gao, L. Shi, T. Zhang, A. Ren, A. Jiang, H. Yu, M. Zhao // Applied and Environmental Microbiology. - 2018. - Vol. 84, № 13. – P. e00438-18.
69. García-Latorre, C. Protective effects of filtrates and extracts from fungal endophytes on *Phytophthora cinnamomi* in *Lupinus luteus* / C. García-Latorre, S. Rodrigo, O. Santamaria // Plants. - 2022. - Vol. 11, № 11. — P. 1455.
70. Gil-Gil, T. Antimicrobial resistance: A multifaceted problem with multipronged solutions / T. Gil-Gil, P. Laborda, F. Sanz-García, S. Hernando-Amado, P. Blanco, J. L. Martínez // MicrobiologyOpen. - 2019. - Vol. 8, № 11. – P. e945.
71. Gray, T. A. Blending genomes: distributive conjugal transfer in *mycobacteria*, a sexier form of HGT / T. A. Gray, K. M. Derbyshire // Molecular microbiology. - 2018. - Vol. 108, № 6. - P. 601-613.
72. Green, H. D. Intra-strain colony biofilm heterogeneity in uropathogenic *Escherichia coli* and the effect of the NlpI lipoprotein / H. D. Green, G. T. Van Horn, T. Williams, A. Eberly, G. H. Morales, R. Mann, I. M. Hauter, M. Hadjifrangiskou, J. E. Schmitz // Biofilm. – 2024. – Vol. 8. – P. 100214.

73. Grossman, A. B. Quantification of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by crystal violet and confocal microscopy / A. B. Grossman, D. J. Burgin, K. C. Rice // *Staphylococcus aureus: Methods and Protocols*. – 2021. – P. 69-78.
74. Grill, M. P. Small extracellular particles with big potential for horizontal gene transfer: membrane vesicles and gene transfer agents / M. P. Grill, M. E. Mulligan, A. S. Lang // *FEMS Microbiology Letters*. - 2018. - Vol. 365, № 19. - P. fny192.
75. Guerrieri, A. Allosteric Enzyme-Based Biosensors—Kinetic Behaviours of Immobilised L-Lysine- α -Oxidase from *Trichoderma viride*: pH Influence and Allosteric Properties / A. Guerrieri, R. Ciriello, G. Bianco F. De Gennaro, S. Frascaro // *Biosensors*. - 2020. - Vol. 10, № 10. - P. 145.
76. Guo, R. Structures and Biological Activities of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum* / R. Guo, G. Li, Z. Zhang, X. Peng // *Marine Drugs*. - 2022. - Vol. 20, № 11. - P. 701.
77. Guo, Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus* / Y. Guo, G. Song, M. Sun, J. Wang, Y. Wang // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. - 2020. - Vol. 10. – P.107.
78. Gupta, A. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials / A. Gupta, S. Mumtaz, C.H. Li, I. Hussain, V.M. Rotello // *Chemical Society Reviews*. - 2019. - Vol. 48, № 2. - P. 415-427.
79. Hadrup, N. Pulmonary toxicity of silver vapours, nanoparticles and fine dusts: A review / N. Hadrup, A. K. Sharma, K. Loeschner, N. R. Jacobsen // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. - 2020. - Vol. 115. - P. 104690.
80. Harris, G. Biologically active compounds isolated from aerobic fermentation of *Trichoderma viride* / G. Harris // *Biotechnology Advances*. - 1996. - Vol. 14, № 1. - P. 121.
81. Harris, H. Multicenter evaluation of an MIC-based aztreonam and ceftazidime-avibactam broth disk elution test / H. Harris, L. Tao, E. B. Jacobs, Y. Bergman, A. Adebayo, T. Tekle // *Journal of clinical microbiology*. – 2023. – Vol. 61. – №. 5. – P. e01647-22

82. Harwoko, H. Dithiodiketopiperazine derivatives from endophytic fungi *Trichoderma harzianum* and *Epicoccum nigrum* / H. Harwoko, G. Daletos, F. Stuhldreier, J. Lee, S. Wesselborg, M. Feldbrügge, P. Proksch // *Natural Product Research*. — 2021. — Vol. 35, № 2. — P. 257-265.
83. Hassanshahi, G. Resistance pattern of *Escherichia coli* to levofloxacin in Iran, a narrative review / G. Hassanshahi, A. Darehkordi, M. S. Fathollahi, S. K. Falahati-Pour, E. R. Zarandi, S. Assar // *Iranian Journal of Microbiology*. - 2020. – Vol. 12, № 3. - P. 177-184.
84. Honkanen, M. Periprosthetic Joint Infections as a Consequence of Bacteremia / M. Honkanen, E. Jämsen, M. Karpelin, R. Huttunen, A. Eskelinen, J. Syrjänen // *Open Forum Infectious Diseases*. - 2019. - Vol. 6, № 6. – P. Ofz218.
85. Howell, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts / C. R. Howell // *Plant Disease*. - 2003. - Vol. 87, № 1. - P. 4-10.
86. Howell, C. R. The role of antibiosis in biocontrol *Trichoderma* and *Gliocladium* / C.R. Howell // *Enzymes, biological control and commercial application*. - 1998. - Vol. 2. - P. 173-184.
87. Huemer, M. Antibiotic resistance and persistence - Implications for human health and treatment perspectives / M. Huemer, S. S. Mairpady, S. D. Brugger, A. S. Zinkernagel // *EMBO reports*. - 2020. - Vol. 21, №. 12. - P. e51034.
88. John Jr, J. The treatment of resistant staphylococcal infections / J. John Jr // *F1000Research*. - 2020. - Vol. 9. - P. 150.
89. Khare, T. Exploring Phytochemicals for Combating Antibiotic Resistance in Microbial Pathogens / T. Khare, U. Anand, A. Dey, Y.G. Assaraf, Z.S. Chen, Z. Liu, V. Kumar // *Frontiers in Pharmacology*. - 2021. - Vol. 12. - P.720726.
90. Khawbung, J. L. Drug resistant Tuberculosis: A review / J. L. Khawbung, D. Nath, S. Chakraborty // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. - 2021. - Vol. 74. - P. 101574.

91. Kim, T. K. T test as a parametric statistic /T.K. Kim //Korean journal of anesthesiology. – 2015. – Vol. 68. – №. 6. – P. 540-546.
92. Kitagawa, M. Structural basis of enzyme activity regulation by the propeptide of l-lysine α -oxidase precursor from *Trichoderma viride* / M. Kitagawa, N. Ito, Y. Matsumoto, M. Saito, T. Tamura, H. Kusakabe, K. Imada // Journal of Structural Biology: X. - 2021. - Vol. 5. - P. 100044.
93. Kondo, H. Structural basis of strict substrate recognition of l-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride* / H. Kondo, M. Kitagawa, Y. Matsumoto, M. Saito, M. Amano, S. Sugiyama, K. Imada // Protein Science. - 2020. - Vol. 29, № 11. - P. 2213-2225.
94. Kong, H.K. Fine-tuning carbapenem resistance by reducing porin permeability of bacteria activated in the selection process of conjugation / H.K. Kong, Q. Pan, W.U. Lo, X. Liu, C.O. Law, T.F. Chan, T.C.K. Lau // Scientific Reports. - 2018. - Vol. 8, N. 1. - P.15248.
95. Kongkham, B. Opportunities and challenges in managing antibiotic resistance in bacteria using plant secondary metabolites / B. Kongkham, D. Prabakaran, H. Harman, G. P. Kubicek // Trichoderma and Gliocladium, volume 2: Enzymes, biological control and commercial applications. -1998.-Vol.2.- P.234-261.
96. Kubicek, C. P. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species / C. P. Kubicek, Q. A. S. Steindorff, K. Chenthamara, G. Manganiello, B. Henrissat, J. Zhang, I. S. Druzhinina, Shen, G. Vannacci // BMC Genomics. - 2019. - Vol. 20. - P. 1-24.
97. Kubicek, C.P. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma* / C.P. Kubicek, M.E. Penttila, G.E. Harman // Agricultural and Biological Chemistry. - 1998. - Vol. 44, № 2. - P. 387-392.
98. Kusakabe, H. A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties / H. Kusakabe, K. Kodama, A. Kuninaka, H. Yoshino, H. Misono, K. Soda // Journal of Biological Chemistry. - 1980. - Vol. 255, №. 3. - P. 976-981.

99. Kusakabe, H. Effect of-Lysine α -Oxidase on Growth of Mouse Leukemic Cells / H. Kusakabe, K. Kodama, A. Kuninaka, H. Yoshino, K. Soda // *Agricultural and Biological Chemistry*. - 1980. - Vol. 44, №. 2. - P. 387-392.
100. Kusakabe, H. Extracellular production of L-lysine α -oxidase in wheat bran culture of a strain of *Trichoderma viride* / H. Kusakabe, K. Kodama, A. Kuninaka, H. Yoshino, K. Soda // *Agricultural and Biological Chemistry*. — 1979. — Vol. 43, №. 12. — P. 2531-2535.
101. Laws, M. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions / M. Laws, A. Shaaban, K. M. Rahman // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2019. - Vol. 43, № 5. - P. 490-516.
102. Lee, D. S. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance / D. S. Lee, S.J. Lee, H.S. Choe // *BioMed Research International*. - 2018. - Vol. 2018, №1. - P. 7656752.
103. Lerminiaux, N. A. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments / N. A. Lerminiaux, D. S. Cameron // *Canadian Journal of Microbiology*. - 2019. - Vol. 65, №. 1. - P. 34-44.
104. Li, M.F. Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. / M.F. Li, G.H. Li, K.Q. Zhang // *Metabolites*. — 2019. — Vol. 9, №. 3. — P. 58
105. Li, M.F. Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. / M.F. Li, G.H. Li, K.Q. Zhang // *Metabolites*. - 2019. - Vol. 9, №. 3. - P. 58.
106. Li, N. MtTRC-1, a novel transcription factor, regulates cellulase production via directly modulating the genes expression of the Mthac-1 and Mtcbh-1 in *Myceliophthora thermophila* / N. Li, Y. Liu, D. Liu, C. Zhang, L. Lin, C. Tian // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2022. - Vol. 88, № 19. – P.e01263-22.
107. Li, X. Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides / X. Li, S. Zuo, B. Wang, K. Zhang, Y. Wang // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – №. 9. – P. 2675.

108. Li, Y. Interactions between anaerobic fungi and methanogens in the rumen and their biotechnological potential in biogas production from lignocellulosic materials / Y. Li, Z. Meng, Y. Xu, Q. Shi, Y. Ma, M.Aung, W. Zhu // *Microorganisms*. - 2021. - Vol. 9, № 1. - P. 190.
109. Lima, B. New short cationic antibacterial peptides. Synthesis, biological activity and mechanism of action/ B. Lima, M. Ricci, A. Garro, T. Juhász, I. Csilla Szigyártó, Z. I. Papp, G. Feresin, J. Garcia de la Torre, J. L. Cascales, L. Fülöp, T. Beke-Somfai, R. D. Enriz // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2021. – Vol. 1863. – №. 10. – P. 183665.
110. Limón, M.C. Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain / M. C. Limón, M. R. Chacón, R. Mejias, J. Delgado-Jarana, A.M. Rincón, A.C. Codón, T. Benítez // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2004. - Vol. 64. - P. 675-685.
111. Liu, Y. Natural indole-containing alkaloids and their antibacterial activities / Y. Liu, Y. Cui, L. Lu, Y. Gong, W. Han, G. Piao // *Archiv der Pharmazie*. — 2020. — Vol. 353, №. 10. – P.2000120
112. Lowry, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent/ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J Biol Chem*. – 1951. – Vol. 193. – №. 1. – P. 265-275.
113. Lukashova, E. V. Effect of L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D on pheochromocytoma PC12 cell line / E. V. Lukashova, T. N. Fedorova, M.G. Makletsova, A.Y. Arinbasarova, A.G. Medentzev, T.T. Berezov // *Biomeditsinskaya khimiya*. - 2015. - Vol. 61, N.1. - P. 99-104.
114. Lukashova, E. V. Fungal enzyme l-lysine α -oxidase affects the amino acid metabolism in the brain and decreases the polyamine level / E.V. Lukashova, M.G. Makletsova, A.N. Lukashov, G. Babayeva, A.Y. Arinbasarova, A.G. Medentzev // *Pharmaceuticals*. - 2020. - Vol. 13, №. 11. - P. 398.

115. Lukasheva, E. V. L-Lysine α -oxidase: enzyme with anticancer properties / E. V. Lukasheva, G. Babayeva, S. S. Karshieva, D.D. Zhdanov, V.S. Pokrovsky // *Pharmaceuticals*. - 2021. - Vol. 14, №. 11. - P. 1070.
116. Luna, J. A. Tuberculosis multirresistente diez años después / J. A. C. Luna, G. P. Mendoza, F. R. de Castro // *Medicina Clínica*. — 2021. — Vol. 156, № 8. — P. 393-401.
117. Lv, L. Emergence of a plasmid-encoded resistance-nodulation-division efflux pump conferring resistance to multiple drugs, including tigecycline, in *Klebsiella pneumoniae* / L. Lv, M. Wan, C. Wang, X. Gao, Q. Yang, S.R. Partridge, J.H. Liu // *mBio*. - 2020. - Vol. 11, №. 2. - P. 10-1128.
118. Ma, J.T. Natural imidazole alkaloids as antibacterial agents against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from kiwi endophytic fungus *Fusarium tricinctum* / J.T. Ma, J.X. Du, Y. Zhang, J.K. Liu, T. Feng, J. He // *Fitoterapia*. — 2022. — Vol. 156. — P. 105070.
119. Magaldi, S. Well diffusion for antifungal susceptibility testing/ S. Magaldi, S. Mata-Essayag, C. H. De Capriles, C. Pérez, M. T. Colella, C. Olaizola, Y. Ontiveros // *International journal of infectious diseases*. – 2004. – Vol. 8. – №. 1. – P. 39-45.
120. Manohar, P. Phage-antibiotic combinations to control *Pseudomonas aeruginosa* – *Candida* two-species biofilms / P. Manohar, B. Loh, R. Nachimuthu, S. Leptihn // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14. – №. 1. – P. 9354.
121. Marín-Palma, D. Curcumin inhibits in vitro SARS-CoV-2 infection in Vero E6 cells through multiple antiviral mechanisms / D. Marín-Palma, J. H. Tabares-Guevara, M. I. Zapata-Cardona, L. Flórez-Álvarez, L. M. Yepes, M. T. Rugeles, Z. B. Wildeman, C. Juan, N. A. Taborda // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – №. 22. – P. 6900.
122. Martinez, D. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*)/ D. Martinez, R. M. Berka, B. Henrissat, M. Saloheimo, M. Arvas, S. E. Baker, J. Chapman,

- O. Chertkov, P. M. Coutinho, D. Cullen, E. G. J. Danchin, I.V. Grigoriev, P. Harris, M. Jackson, C. P. Kubicek, C. S. Han, I. Ho, L. F. Larrondo, A. Lopez de Leon, J. K. Magnuson, S. Merino, M. Misra, B. Nelson, N. Putnam, B. Robbertse, A. A. Salamov, M. Schmoll, A. Terry, N. Thayer, A. Westerholm-Parvinen, C. L. Schoch, J. Yao, R. Barabote, M. A. Nelson, C. Detter, D. Bruce, C. R. Kuske, G. Xie, P. Richardson, D. S. Rokhsar, S.M. Lucas, E. M. Rubin, N. Dunn-Coleman, M. Ward, T. S. Brettin // *Nature biotechnology*. – 2008. – Vol. 26. – №. 5. – P. 553-560.
123. Matuschek, E. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories / E. Matuschek, D.F. Brown, G. Kahlmeter // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2014. - Vol. 20, № 4. - P. O255-O266.
124. McEwen, S. A. Antimicrobial resistance: a one health perspective / S. A. McEwen, P. J. Collignon // *Microbiology Spectrum*. — 2018. — Vol. 6, №. 2. – P.521-547.
125. McGuinness, W. A. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus* / W. A. McGuinness, N. Malachowa, F. R. DeLeo // *Yale J Biol Med*. - 2017. - Vol. 90, № 2 - P. 269-281.
126. Melander, R. J. Narrow-spectrum antibacterial agents / R. J. Melander, D. V. Zurawski, C. Melander // *Medchemcomm*. - 2018. - Vol. 9, №. 1. - P. 12-21.
127. Mertens, J. Comparative in vivo toxicokinetics of silver powder, nanosilver and soluble silver compounds after oral administration to rats / J. Mertens, A. Alami, K. Arijs // *Archives of Toxicology*. - 2023. - Vol. 97, №. 7. - P. 1859-1872.
128. Metzger, G. A. Biofilms preserve the transmissibility of a multi-drug resistance plasmid / G. A. Metzger, B. J. Ridenhour, M. France, K. Gliniewicz, J. Millstein, M.L. Settles, E.M. Top // *npj Biofilms and Microbiomes*. - 2022. - Vol. 8, № 1.- P.95.

129. Miethke, M. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics / M. Miethke, M. Pieroni, T. Weber, M. Brönstrup, P. Hammann, L. Halby, R. Müller // *Nature Reviews Chemistry*. - 2021. - Vol. 5, № 10. — P. 726-749.
130. Missoum, A. Recombinant Protein Production and Purification Using Eukaryotic Cell Factories / A. Missoum // *Methods in Molecular Biology*. - 2021. - P. 215-228.
131. Mohanty, S. Engineering of deglycosylated and plasmin resistant variants of recombinant streptokinase in *Pichia pastoris* / S. Mohanty, Y. P. Khasa// *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2018. — Vol. 102, № 24. — P. 10561-10577.
132. Munir, M. U. Recent advances in nanotechnology-aided materials in combating microbial resistance and functioning as antibiotics substitutes / M. U. Munir, A. Ahmed, M. Usman, S. Salman // *International Journal of Nanomedicine*. - 2020. -Vol. 15. - P. 7329-7358.
133. Munita, J. M. Mechanisms of antibiotic resistance / J. M. Munita, C. A. Arias // *Microbiology Spectrum*. - 2016. - Vol. 4, №. 2. – P. 481-511.
134. Nadella, R. K. Multi-drug resistance, integron and transposon-mediated gene transfer in heterotrophic bacteria from *Penaeus vannamei* and its culture environment / R. K. Nadella, S. K. Panda, M. R. Badireddy, P.P. Kurchheti, R.P. Raman, M.P. Mothadaka // *Environmental Science and Pollution Research*. — 2022. — Vol. 29, №. 25. — P. 37527-37542.
135. Ness, D. UTI in kidney transplant / D. Ness, J. Olsburgh // *World Journal of Urology*. - 2020. - Vol. 38, №. 1. - P. 81-88.
136. Nieuwlaat, R. Coronavirus disease 2019 and antimicrobial resistance: parallel and interacting health emergencies / R. Nieuwlaat, L. Mbuagbaw, D. Mertz, L.L. Burrows, D.M. Bowdish, L. Moja, H.J. Schünemann // *Clinical Infectious Diseases*. - 2021. - Vol. 72, №. 9. - P. 1657-1659.
137. Niu, L. Genetic Engineering of Starch Biosynthesis in Maize Seeds for Efficient Enzymatic Digestion of Starch during Bioethanol Production / L.

- Niu, L. Liu, J. Zhang, M. Scali, W. Wang, X. Hu, X. Wu // International Journal of Molecular Sciences. - 2023. - Vol. 24, №. 4. - P. 3927.
138. Persoon, C. H. Beschreibung von *Trichoderma* / C. H. Persoon // Annalen der Botanik. - 1794. - Vol. 1. - P. 25–28.
139. Poirel, L. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* / L. Poirel, J.Y. Madec, A. Lupo, A.K. Schink, N. Kieffer, P. Nordman, S. Schwarz // Microbiology Spectrum. — 2018. — Vol. 6, № 4. — P. 10-1128.
140. Pripp, A. H. Pearson's or Spearman's correlation coefficients/ A. H. Pripp // Tidsskrift for den Norske lægeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke. – 2018. – Vol. 138. – №. 8.
141. Rather, M. A. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies / M. A. Rather, K. Gupta, M. Mandal // Brazilian Journal of Microbiology. - 2021. - Vol. 52, №. 4. - P. 1701-1718.
142. Ren, H. Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products / H. Ren, B. Wang, H. Zhao // Current opinion in biotechnology. - 2017. - T. 48. – P. 21–27.
143. Rifai, M. A. Taxonomical classification of *Trichoderma* / M. A. Rifai // Transactions of the British Mycological Society. - 1969. - Vol. 52, №2. - P. 121–128.
144. Rogelio, A. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation / A. Baez-Rogelio, Y.E. Morales-García, V. Quintero-Hernández, J. Muñoz-Rojas // Microbial Biotechnology. - 2017. - Vol. 10, № 1. - P. 19-21.
145. Rossiter, S. E. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance / S. E. Rossiter, M. H. Fletcher, W. M. Wuest // Chemical reviews. - 2017. - Vol. 117, № 19. - P. 12415-12474.
146. Roth, N. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview / N. Roth, A. Käsbohrer, S. Mayrhofer, U. Zitz, C. Hofacre, K.J. Domig // Poultry science. - 2019. - Vol. 98, № 4. - P. 1791-1804.

147. Saak, C. C. Experimental approaches to tracking mobile genetic elements in microbial communities / C. C. Saak, C. B. Dinh, R. J. Dutton // FEMS Microbiology Reviews. - 2020. - Vol. 44, № 5. - P. 606-630.
148. Salvia, T. Phenotypic Detection of ESBL, AmpC, MBL, and Their Co-occurrence among MDR *Enterobacteriaceae* Isolates / T. Salvia, K. G. Dolma, O. P. Dhakal, B. Khandelwal, L.S. Singh // Journal of Laboratory Physicians. - 2022. - Vol. 14, № 03. - P. 329-335.
149. Samuels, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus / G. J. Samuels // Mycological Research. - 1996. - Vol. 100, № 8. - P. 923-935.
150. Samuels, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology / G. J. Samuels // Phytopathology. - 2006. - Vol. 96, № 2. - P. 195-206.
151. San, A. M. Evolution of plasmid-m antibiotic resistance in the clinical context / A. M. San // Trends in microbiology. — 2018. — Vol. 26, № 12. — P. 978-985.
152. Sandmann, G. Carotenoids and their biosynthesis in fungi / G. Sandmann // Molecules. - 2022. - Vol. 27, № 4. - P. 1431.
153. Saravanakumar, K. Monoclonal antibody functionalized, and L-lysine α -oxidase loaded PEGylated-chitosan nanoparticle for HER2/Neu targeted breast cancer therapy / K. Saravanakumar, A. Sathiyaseelan, S. Park, S.R. Kim, V.V. Priya, M.H. Wang // Pharmaceutics. - 2022. - Vol. 14, № 5. - P. 927.
154. Saravanakumar, K. Isolation of polysaccharides from *Trichoderma harzianum* with antioxidant, anticancer, and enzyme inhibition properties / K. Saravanakumar, S. Park, A. Sathiyaseelan, A.V.A. Mariadoss, S. Park, S.J. Kim, M.H. Wang // Antioxidants. - 2021. - Vol. 10, № 9. - P. 1372.
155. Saravanakumar, K. Novel metabolites from *Trichoderma atroviride* against human prostate cancer cells and their inhibitory effect on *Helicobacter pylori* and *Shigella* toxin producing *Escherichia coli* / K. Saravanakumar, S.

- Mandava, R. Chellia, E. Jeevithan, R.S.B. Yelamanchi, D. Mandava, M.H. Wang // *Microbial pathogenesis*. - 2019. - Vol. 126. - P. 19-26.
156. Saxena, N. et al. Evaluation of Congo red agar for detection of biofilm production by various clinical *Candida* isolates / N. Saxena, D. Maheshwari, D. Dadhich, S. Singh // *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*. - 2014. - Vol. 3. - №. 59. - P. 13234-13238.
157. Schmoll, M. The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species / M. Schmoll, C. Dattenböck, N. Carreras-Villaseñor, A. Mendoza-Mendoza, D. Tisch, M. I. Alemán, A. Herrera-Estrella // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2016. — Vol. 80, № 1. — P. 205-327.
158. Shahryari, Z. Amylase and xylanase from edible fungus *Neurospora intermedia*: Production and Characterization / Z. Shahryari, M. H. Fazelipour, Y. Ghasemi, P.R. Lennartsson, M.J. Taherzadeh // *Molecules*. - 2019. - Vol. 24, № 4. - P. 721.
159. Shen, Z. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. / Z. Shen, Y. Wang, Q. Zhang, J. Shen // *Microbiology spectrum*. - 2018. - Vol. 6, № 2. - P.10-1128.
160. Sheppard, A. E. Nested Russian doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the carbapenem resistance gene bla KPC / A. E. Sheppard, N. Stoesser, D. J. Wilson, R. Sebra, A. Kasarskis, L.W. Anson, A. J. Mathers // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2016. - Vol. 60, № 6. - P. 3767-3778.
161. Shi, T. Terpenoids from the coral-derived fungus *Trichoderma harzianum* (XS-20090075) induced by chemical epigenetic manipulation / T. Shi, C. Shao, Y. Liu D. L. Zhao, F. Cao, X. M. Fu, C. Y. Wang // *Frontiers in Microbiology*. - 2020. - Vol. 11. - P.572.
162. Shi, X. Antimicrobial polyketides from *Trichoderma koningiopsis* QA-3, an endophytic fungus obtained from the medicinal plant *Artemisia argyi* /

- X. Shi, D. J. Wang, X. M. Li, H. L. Li, L. H. Meng, X. Li, B. G. Wang // RSC advances. - 2017. - Vol. 7, № 81. - P. 51335-51342.
163. Shi, Z. Z. Antifungal and antimicrobial trichothecene sesquiterpenes from the marine algicolous fungus *Trichoderma brevicompactum* A-DL-9-2 / Z. Z. Shi, X.H. Liu, X.N. Li, N.Y. Ji // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2020. - Vol. 68, № 52. - P. 15440-15448.
164. Shi, Z. Z. Trichocarotins A–H and trichocadinin A, nine sesquiterpenes from the marine-alga-epiphytic fungus *Trichoderma virens* / Z. Z. Shi, S. T. Fang, F. P. Miao, X.L. Yin, N.Y. Ji // Bioorganic Chemistry. - 2018. - Vol. 81. - P. 319-325.
165. Simmons, E. T. Renaming of *T. reesei* / E. T. Simmons // Mycologia. - 1977. - Vol. 69, № 6. - P. 1121–1124.
166. Simonian, M. H. Spectrophotometric determination of protein concentration/ M. H. Simonian // Current Protocols in Cell Biology. – 2002. – Vol. 15. №. 1. – P. A. 3B. 1-A. 3B. 7.
167. Singh, V. Strategies to combat multi-drug resistance in tuberculosis / V. Singh, K. Chibale // Accounts of Chemical Research. - 2021. - Vol. 54, № 10. - P. 2361-2376.
168. Slettemeås, J. S. Occurrence and characterization of quinolone resistant *Escherichia coli* from Norwegian turkey meat and complete sequence of an IncX1 plasmid encoding qnrS1 / J. S. Slettemeås, M. Sunde, C. R. Ulstad, M. Norström, A. L. Wester, A. M. Urdahl // PLoS One. - 2019. - Vol. 14, № 3. - P. e0212936.
169. Smirnova, I. P Lysine- α -Oxidase in vitro Activity in Experiments on Models of Viruses Sindbis, Forest-Spring Encephalitis, Western Nile, Tyaginya and Dhori/ I. P. Smirnova, V. F. Larichev, Yu.A. Shneider // Antibiot Khimioter Antibiotics and Chemotherapy. - 2015. - Vol. 60. - №3-4. - P. 3-5
170. Smirnova, I.P., Rakovskaya I.V. Antimycoplasmic Activity of Fermentation Broth of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180, an Organism

- Producing L-Lysine- α -Oxidase, an Antitumor and Antiviral Enzyme/ I.P. Smirnova, I.V. Rakovskaya // Antibiot Khimioter Antibiotics and Chemotherapy. - 2014. - Vol. 59.- №11-12. - P. 7-10.
171. Sprenger, M. Metabolic adaptation of intracellular bacteria and fungi to macrophages / M. Sprenger, L. Kasper, M. Hensel, B. Hube // International Journal of Medical Microbiology. - 2018. - Vol. 308, № 1. - P. 215-227.
172. Suarez, S. A. Gene amplification uncovers large previously unrecognized cryptic antibiotic resistance potential in *E. coli* / S. A. Suarez, A. C. Martiny // Microbiology Spectrum. - 2021. - Vol. 9, № 3. - P. e00289-21.
173. Thakur, R. N. Isolation of *Trichoderma* in Madras/ R. N. Thakur, H. S. Norris // Indian Journal of Agricultural Sciences. - 1928.- Vol. 3. - P. 12–16.
174. Thiruchchelvan, N. Effect of Insecticides on Bio-Agent *Trichoderma harzianum* Rifai. Under In vitro Condition. / N. Thiruchchelvan, G. Mikunthan, G. Thirukkumaran, K. Pakeerathan // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. - 2013. - Vol. 13, № 10. - P. 1357-1360.
175. Ting, N. L. Cancer pharmacomicrobiomics: targeting microbiota to optimise cancer therapy outcomes / N. L. Ting, H. C. Lau, J. Yu // Gut. - 2022. - Vol. 71, № 7. - P. 1412-1425.
176. Traber, R. Neue cyclopeptide aus *Trichoderma polysporum* (LINK EX PERS.) Rifai: die cyclosporine B, D und E / R. Traber, M. Kuhn, H. Loosli, W. Pache, A. Von Wartburg // Helvetica Chimica Acta. - 1977. - Vol. 60, № 5. - P. 1568-1578.
177. Tyśkiewicz, R. *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth / R. Tyśkiewicz, A. Nowak, E. Ozimek, J. Jaroszuk-Ściśeł // International Journal of Molecular Sciences. - 2022. - Vol. 23, № 4. - P. 2329.
178. Valgas, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products/ C. Valgas, S. M. D. Souza, E. F. Smânia, Jr. A. Smânia // Brazilian journal of microbiology. – 2007. – Vol. 38. – P. 369-380.

179. Van den Driessche, F. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms/ F. Van den Driessche, P. Rigole, G. Brackman, T. Coenye // *Journal of microbiological methods*. – 2014. – Vol. 98. – P. 31-34.
180. Veeraraghavan, B. Antimicrobial susceptibility profile & resistance mechanisms of Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) priority pathogens from India / B. Veeraraghavan, K. Walia // *Indian Journal of Medical Research*. - 2019. - Vol. 149, № 2. - P. 87-96.
181. Vestergaard, M. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem / M. Vestergaard, D. Frees, H. Ingmer // *Microbiology Spectrum*. - 2019. - Vol. 7, № 2. – P. 10-1128.
182. Vinale, F. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions / F. Vinale, K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, S.L. Woo, M. Lorito // *Soil Biology and Biochemistry*. — 2008. — Vol. 40, № 1. — P. 1-10.
183. Vulin, C. Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters / C. Vulin, N. Leimer, M. Huemer, M. Ackermann, A.S. Zinkernagel // *Nature communications*. - 2018. - Vol. 9, № 1. – P. 4074.
184. Waksman, S. A. Strain specificity and production of antibiotic substances / S. A. Waksman, C. H. Reilly, A. Schatz // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1945. — Vol. 31, № 6. — P. 157-164.
185. Wang, C. H. A resistance mechanism in non- mcr colistin-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: R81H substitution in PmrA Is an independent factor contributing to colistin resistance / C. H. Wang, L. K. Siu, F. Y. Chang, S.K. Chiu, J.C. Lin // *Microbiology Spectrum*. - 2021. - Vol. 9, № 1. – P. 10-1128.
186. Wang, X. Structural diversity and biological activities of fungal cyclic peptides, excluding cyclodipeptides / X. Wang, M. Lin, D. Xu, D. Lai, L. Zhou // *Molecules*. - 2017. - Vol. 22, № 12. - P. 2069.

187. Weindling, R. Microscopic parasitism by *T. lingorum*/ R. Weindling // *Phytopathology*. - 1932. - Vol. 22, №9. - P. 837–845.
188. Wencewicz, T. A. Crossroads of antibiotic resistance and biosynthesis / T. A. Wencewicz // *Journal of Molecular Biology*. - 2019. - Vol. 431, № 18. - P. 3370-3399.
189. Westbye, A. B. Guaranteeing a captive audience: coordinated regulation of gene transfer agent (GTA) production and recipient capability by cellular regulators / A. B. Westbye, J. T. Beatty, A. S. Lang // *Current Opinion in Microbiology*. - 2017. - Vol. 38. - P. 122-129.
190. Wood, T. K. Strategies for combating persister cell and biofilm infections / T. K. Wood // *Microbial Biotechnology*. - 2017. - Vol. 10, № 5. — P. 1054-1056.
191. World Bank and the World Health Organization. *Sustaining Action Against Antimicrobial Resistance: A Case Series of Country Experiences*. - 2022.
192. World Health Organization. *WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed*. - 2017.
193. Yamazaki, H. Antifungal trichothecene sesquiterpenes obtained from the culture broth of marine-derived *Trichoderma cf. brevicompactum* and their structure-activity relationship / H. Yamazaki, A. Yagi, O. Takahashi, Y. Yamaguchi, A. Saito, M. Namikoshi, R. Uchida // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. - 2020. - Vol. 30, № 17. - P. 127375.
194. Yan, J. Integrated lipase production and in situ biodiesel synthesis in a recombinant *Pichia pastoris* yeast: an efficient dual biocatalytic system composed of cell free enzymes and whole cell catalysts / J. Yan, X. Zheng, L. Du, S. Li // *Biotechnology for Biofuels*. - 2014. - Vol. 7. - P. 1-8.
195. Yarygin, K. S. Resistomap — online visualization of human gut microbiota antibiotic resistome / K. S. Yarygin, B. A. Kovarsky, T. S. Bibikova, D. S. Melnikov, A. V. Tyakht, D. G. Alexeev // *Bioinformatics*. - 2017. - Vol. 33, № 14. - P. 2205-2206.

196. Yedidia, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants / I. Yedidia, A. K. Srivastva, Y. Kapulnik, I. Chet // Plant and Soil. - 2001. - Vol. 235, № 2. - P. 235-242.
197. Yin, M. Herbicidal efficacy of harzianums produced by the biofertilizer fungus, *Trichoderma brevicompactum* / M. Yin, O. E. Fasoyin, C. Wang, Q. Yue, Y. Zhahg, B. Dun, L. Zhang // AMB Express. - 2020. - Vol. 10. - P. 1-8.
198. Zhang, J.L. *Trichoderma*: A Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites With Medicinal Importance / J.L. Zhang, W.L. Tang, Q.R. Huang, Y.Z. Li, M.L. Wei, L.L. Jiang, C. Liu, X. Yu, H.W. Zhu, C.Z. Chen, X.X. Zhang // Frontiers in Microbiology. - 2021. - Vol. 12. - P.723828.
199. Zhang, X. J. Purification, characterization, and functional groups of an extracellular aflatoxin M1-detoxifizyme from *Bacillus pumilus* E-1-1-1/ X. J. Zhang, J. Gao, J. Han, X. H. Wang, Y. X. Sang//MicrobiologyOpen. – 2019. – Vol. 8. – №. 10. – P. e868.
200. Zhao, X. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives / X. Zhao, F. Zhao, J. Wang, N. Zhong // RSC Advances. - 2017. - Vol. 7, № 58. - P. 36670-36683.
201. Zhou, K. A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus* / K. Zhou, C. Li, D. Chen, Y. Pan, Y. Tao, W. Qu, S. Xie // International Journal of Nanomedicine. - 2018. - Vol. 13. - P. 7333-7347.
202. Zhou, S. Synthesis, and antimalarial and antibacterial activities of marine alkaloids / S. Zhou, G. Huang // Chemical Biology & Drug Design. - 2021. - Vol. 98, № 2. - P. 226-233.