

НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Мошинець Олена Володимирівна



УДК 579.2+579.6+606+616-095+616-03

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ І СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ І
КЛІНІЧНІ АСПЕКТИ БІОПЛІВОК ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ**

03.00.20 - біотехнологія (біологічні науки)

АВТОРЕФЕРАТ

Дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

Київ

2025

Дисертація є кваліфікаційною науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей

Роботу виконано у відділі регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий консультант:

Член-кор. НАН України, доктор біологічних наук, професор
Кордюм Віталій Арнольдович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу регуляторних механізмів клітини.

Офіційні опоненти:

член-кор. НАН України, доктор біологічних наук, професор,
Сергєєва Тетяна Анатоліївна
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
відділ біомолекулярної електроніки;

академік НАН України, доктор біологічних наук, професор
Костерін Сергій Олексійович
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
заступник директора;

академік НАН України, доктор біологічних наук, професор
Підгорський Валентин Степанович
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН
України,
завідувач відділом фізіології промислових мікроорганізмів.

Захист дисертації відбудеться 2 жовтня 2025 року о 10.30 годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д.26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143 м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розіслано 1 вересня 2025 року.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.

І. В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Протягом майже всього періоду розвитку клінічної мікробіології за виключенням останніх тридцяти років бактерії, як збудники інфекційних хвороб, сприймалися виключно як індивідуальні організми мікроскопічного розміру з індивідуальними властивостями щодо патогенезу, колонізації та стійкості до антибактеріальної терапії. Втім сучасна фундаментальна мікробіологія, змінила своє уявлення щодо «персоналізації» бактерій. Починаючи із 1994 року вийшла серія робіт Costerton J.W. в яких було систематизоване уявлення про біоплівки, як форму колонізації еко ніші при інфекційному процесі (Costerton et al., 1994; Costerton et al., 1995). З того часу, традиційні уявлення щодо існування популяцій мікроорганізмів стали змінюватись. Принаймні, стало зрозуміло, чому хірургічна санація осередків інфекції в організмі здатна значно підвищувати ефективність лікування на тлі антибіотикотерапії, чому багато антибіотиків, до яких бактерії чутливі на клітинному рівні, залишаються малоефективними *in vivo* або, навпаки, неочікувано мають підвищену ефективність, та чому досить старий метод лікування гайморитів введенням розчинів трипсину мав ефективність (Buysck et al., 2012; Moshynets et al., 2022; Shenkutie et al., 2022). Причина всіх цих явищ – здатність бактерій до колективної поведінки, в наслідок якої утворюються над клітинні просторові агрегації – біоплівки.

Біоплівка – просторове угруповання бактеріальних клітин, які міцно вбудовані в шари позаклітинного високополімерного матриксу. Біоплівка з екологічного погляду представляє собою нову, створену бактеріями, еконішу, яка виконує головну функцію – захист бактеріальних клітин від зовнішніх стресів. Перепади температур, посуха, атаки хижаків та токсинів – все це суттєво знижує бактеріолітичний ефект якщо ті самі бактерії встигли побудувати біоплівку (Müsken et al., 2017; Thöming & Häussler, 2022). Але, біоплівка є динамічною структурою, через що, в певний час свого онтогенезу, вона стає перенаселеною та токсичною для своїх же мешканців. З іншого боку, бактерії, які були настільки успішні, що змогли побудувати свою біоплівку при заданих умовах, можуть претендувати і на подальшу колонізацію простору. Але робити це шляхом розростання біоплівки не є достатнім, адже проблема накопичення токсинів та недостатність поживних речовин в біоплівці залишається, що стимулює подальше розповсюдження колонізації через активацію планктонного способу життя. Таким чином, існує циклічність розвитку біоплівки – від сталої до рухливої форм. Таке чергування прикріпленої та рухливої форм, або біоплівки та планктону є життєвим циклом бактерії.

На молекулярному рівні переключення двох альтернативних метаболічних форм реалізується через регуляцію концентрації головного вторинного месенджера - циклічного ді-гуанілмонофосфату, або ц-ді-ГМФ, а ферменти, які відповідають за його накопичення та утилізацію структурно подібні до системи регуляції адреналіну (для вивільнення останнього необхідне підвищення рівню циклічного аденозинмонофосфату, або цАМФ). Біоплівкова (прикріплена)

форма існування створюється на фоні підвищеного рівня ц-ді-ГМФ, а планктонна – за умов низького рівня ц-ді-ГМФ. Цікаво, що рівні ц-ді-ГМФ бактерії у більшості випадків корелюються через популяційний гормональний сигналінг – почуття кворуму. Концентрація сигнальних месенджерів в популяції, тобто в міжклітинному просторі, визначає рівень ц-ді-ГМФ в кожній окремій клітині. Через відчуття рівня сигнальних месенджерів, в популяції, бактерії координують свою генетичну програму та здатні таким чином до колективної поведінки (Williams & Cámara, 2009; Galloway et al., 2011; Garg et al., 2014).

Формування і властивості біоплівок залежать від індивідуальних характеристик штаму, адже для протистояння висиханню та утримання на поверхні рідини або супротиву току рідини на рівні зануреної поверхні необхідні різні механізми. Важливо пам'ятати, що існування бактерій у біоплівці, яка є природнім угрупованням, дуже відрізняється від існування тих самих бактерій за умов існування їх колоній на агаризованому середовищі, яке за своєю суттю є штучним. Саме через ці відмінності у природніх і штучних угрупованнях, тобто у біоплівках і колоніях, не дозволяють використовувати агаризовані колонії як універсальну модель дослідження чутливості бактерій до антибіотику.

На клітинному рівні біоплівка є складним багатокомпонентним утворенням. Схематично її можна розділити на дві фракції – на клітини та позаклітинний полімерний матрикс. Біоплівки бактерій утворюються в результаті численних і різноманітних фізичних взаємодій. Бактеріальні клітини всередині біоплівки взаємодіють один з одним шляхом тісних, проміжних і далеких взаємодій за участю клітинних поверхонь, поверхневих структур (наприклад, джгутиків та пілей), компонентів матриксу біоплівки та різноманітних поверхонь розподілу фаз (наприклад, розподіл фаз повітря-рідина).

До складу матриксу біоплівки входять різноманітні полімери, які мають різні ступені специфічності. Наприклад, у складі біоплівки грам-позитивних бактерій часто домінують білки, а у грам-негативних, дуже важливим полімером, є різноманітні полісахариди. Цікаво, що структура біоплівки сильно залежить від температурних умов. Так, у представників *Proteobacteria* целюлозний оперон (сукупність генів, що відповідають за продукцію целюлози) репресується при 37°C та активується за умов 28°C і нижче. Це відбувається тому, що протеобактерії із патогенними властивостями здатні використовувати дві альтернативні екологічні стратегії колонізації: целюлоза їм не потрібна для побудови біоплівки при патогенній колонізації тканин пацієнта, але вона дуже вдало допомагає депонувати вологу та протистояти посузі при вільному сапрофітному існуванні (Solano et al., 2002; Zogaj et al., 2003; Ude et al., 2006). Дуже розповсюдженими структурними елементами біоплівок всіх бактерій є екзоклітинна ДНК, або еДНК (Okshevsky & Meyer, 2015; Jakubovics et al., 2013; de Aldecoa et al., 2017; Campoccia et al., 2021; Vandana, 2022). Цей полімер виконує функції первинного адгезину, депонування поживних речовин та

власне структурного полімеру. Для деяких бактерій, наприклад, для *Pseudomonas aeruginosa*, еДНК може бути головним полімером матриксу біоплівки протягом перших 48 годин розвитку. Багато бактерій також використовують функціональні амілоїдні фібрили для первинного прикріплення до поверхні та до компонентів матриксу біоплівки. Не дивлячись на те, що амілоїди є білками, вони є хімічно та біологічно стійкими, малорозчинними та добре адгезуються до еДНК, стабілізуючи таким чином каркас біоплівки.

Біоплівки – це форма колонізації поверхні, зокрема, і критичних поверхонь, захист яких є важливим для реалізації технологічних процесів. Так, захист поверхонь металів в тому числі і вкритих фарбами, та різноманітних пластиків, в тому числі і пластиків медичного призначення є важливим напрямом розвитку нових матеріалів.

Феномен біоплівки має дуже велике значення для терапії інфекційного процесу. Біоплівки суттєво знижують діапазон ефективних антибіотиків серед тих, які виявили ефективність у класичних мікробіологічних тестах. Так, треба мати на увазі, що завдяки великому вмісту еДНК біоплівки *P.aeruginosa* знижують свою чутливість до катіонних пептидів та аміноглікозидів в сотні разів. Та ж сама еДНК в біоплівках *Staphylococcus epidermidis* суттєво знижує біодоступність ванкоміцину. Біоплівка – врівноважена система, яка адаптується до зовнішніх стресорів. Через це, ефективний контроль над інфекційним процесом, який так чи інакше асоційований із біоплівкою збудника, можливий за умов комплексного підходу, а саме, раціонального підбору антибіотику та максимального механічного усунення біоплівки. Зокрема, інфекційні ускладнення, пов'язані із утворенням біоплівки на/в тканинах пацієнта обов'язково потребують максимального усунення біоплівки шляхом розтину та санації абсцесів (тонзиллярні, паратонзиллярні та інші абсцеси), призначення розріджувачів мокроти (пневмонії) або хірургічне видалення інфікованих тканин (панкреатити, ендокардити). Інфекційні ускладнення, пов'язані із утворенням біоплівки на інертних поверхнях – катетерах, імплантах, металевих конструкціях тощо, потребують усунення інертної поверхні (видалення катетеру, імпланту) та максимальне видалення інфікованих тканин (парапротезна інфекція, остеомієліт). Втім, така залежність інфекційного процесу від якості біоплівки залишає вікно можливостей по розробці специфічної антибіоплівкової терапії та розроблення нових матеріалів із зниженим потенціалом по прикріпленню бактерій та їх біообростанню.

Наша робота поглиблює та систематизує знання про біоплівки, зокрема, біоплівки грам-негативних бактерій, та додає нові дані про роль целюлози, екзоклітинної ДНК, амілоїдних фібрил і мембранних везикул та почуття кворуму у біоплівках грам-негативних бактерій та можливості використання сигнальних месенджерів у біотехнологіях для захисту рослин. Окремо досліджується роль біоплівок у розвитку інфекційних процесів та обговорюється та доводиться можливість антибіоплівкової терапії у пацієнтів

із множинної резистентністю та роль біоплівок як джерела генів резистому у госпітальному середовищі.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити біотехнологічні і структурно-функціональні особливості і клінічні аспекти біоплівок грамнегативних бактерій. Для досягнення цієї мети поставлено наступні завдання:

1. Дослідити роль целюлози у структурі біоплівок *Pseudomonas* spp загалом та, зокрема, в структурі біоплівок *Bordetella* spp;
2. Дослідити роль амілоїдогенезу в біоплівках грам-негативних бактерій;
3. Дослідити роль екзоклітинної ДНК, амілоїдних фібрил і мембранних везикул у біоплівці *P.fluorescens* SBW25;
4. Проаналізувати фізіологічну роль почуття кворуму у *P.fluorescens* SBW25;
5. Вивчити особливості патогенезу запальних процесів, опосередкованих біоплівками, зокрема, на прикладі взаємодії біоплівок пародонтопатогенів із імунною системою хазяїна при пародонтиті;
6. Дослідити особливості біоплівкотворення госпітальним патогеном *K. pneumoniae* та розробити засади до комбінованої анти-біоплівкової терапії клебсієльозів;
7. Проаналізувати вірогідність неспецифічної біоплівко-стимулюючої активності нових фармакологічних молекул;
8. Вивчити роль біоплівок як джерела генів резистому у госпітальному середовищі, зокрема, роль біоцидів у підтриманні пулу генів стійкості до антибіотиків;
9. Розробити нові матеріали із анти-біопліковою та анти-ДНК діями для вирішення проблем персистування генів стійкості до антибіотиків у госпітальному середовищі;
10. Дослідити можливість використання бактеріальних сигнальних месенджерів для вирішення завдань у агропромисловості.

Об'єкт дослідження – механізми утворення біоплівок грам-негативними бактеріями, компоненти біоплівок.

Предмет дослідження – бактеріальна целюлоза, амілоїди, мембранні везикула, сигнальні месенджери, екзоклітинна ДНК, патологічні біоплівки і їхня фенотипова чутливість до антибіотиків, терапія полірезистентних грам-негативних інфекцій, антибіотикорезистентність, резистом, нові функціональні матеріали з антимікробними властивостями, нові екологічні біотехнології на основі бактеріальних сигнальних месенджерів.

Методи дослідження: в роботі було застосовано набір загальноприйнятих методів досліджень, зокрема: мікробіологічні методи досліджень (культивування мікроорганізмів та їх біоплівок, вивчення їх морфології методами світлової, флуоресцентної та конфокальної лазерної скануючої мікроскопії, скануючої та трансмісивної електронної мікроскопії (SEM та TEM), вивчення спектрів чутливості до антимікробних препаратів методами дискової дифузії та бульйонних розведень, дослідження біоплівок методом

комбінованого аналізу біоплівки); генетичні й генно-інженерні методи досліджень (отримання і вивчення рекомбінантних штамів бактерій, виділення хромосомної, плазмідної та екзоклітинної ДНК, горизонтальний гель-електрофорез ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), напівкількісна полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією, флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH)); біохімічні методи досліджень (виділення білку, кількісний і якісний аналіз білкового складу проби методом MALDI-TOF Мас-спектрометрії, виділення мембранних везикул з біоплівки і планктонної популяції, діаліз, отримання колагену і колагенового матриксу, вимір хлорофілу і каротиноїдів); цитологічні/культуральні методи (культивування лінії HEK293 та ADSC першого пасажу, оцінка життєздатності еукаріотичних клітин); хімічні методи, методи хімічного синтезу (синтез PHMG-Cl, PA-11/PHMG-NS, PyrC 12 -DBS, C6-HSL); робота з рослинами (підготовка насіння, дослідження схожості насіння, дослідження посівів); біоінформатичний аналіз (ідентифікація гомологів бактеріальної синтази целюлози в геномах протеобактерій, молекулярний докінг-аналіз); статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. В роботі вперше продемонстровано роль целюлози як структурного компонента біоплівки бордетел та показано її адгезивні властивості при утворенні біоплівки на абіотичній поверхні. Вперше досліджено структурну роль функціонального амілоїдогенезу в біоплівках грам-негативних бактерій, зокрема в госпітальних штамів *Klebsiella* spp., продемонстровано генеторегенність амілоїдогенезу у госпітальних клебсієл. Вперше досліджено структурно-функціональну роль функціональних амілоїдів та екзоклітинної ДНК в біоплівках *P. fluorescens* SBW25, доведена важливість еДНК в адгезії і міцності біоплівки. Також детально досліджено утворення мембранних везикул планктонною та біоплівковою субпопуляціями *P. fluorescens* SBW25, порівняно їхній білковий компонент та встановлено, що фізіологічний стан бактеріальної популяції впливає на білки відповідних везикул. Вперше проаналізовано здатності *P. fluorescens* SBW25 до почуття кворуму. Вперше детально досліджено механізми утворення патологічних мультикультурних біоплівок при пародонтиті, встановлено важливу роль екзоклітинної ДНК хазяїна в персистуванні таких біоплівок і підтриманні запалення. Вперше проаналізовано біоплівки госпітальних штамів *K. pneumoniae*, отриманих від українських пацієнтів. Вперше розроблено засади антибіоплівкової терапії полірезистентних інфекцій *K. pneumoniae*. Досліджено неспецифічні біоплівко-стимулюючі активності нових анти-стафілококових фармакологічних молекул, націлених на сортазу А стафілококу. Вперше досліджено біоплівки грам-позитивного і грам-негативного штамів як джерело контамінації генами антибіотикорезистентності простору госпітальної палати через використання різноманітних госпітальних дезінфікуючих засобів. Вперше розроблено нові матеріали із анти-біоплівковою та анти-ДНК дією для деконтамінації лікарняного простору. Вперше доведено можливість використання

бактеріальних сигнальних молекул для підвищення врожайності українських сортів озимої пшениці.

Практичне значення отриманих результатів. Протягом виконання роботи було запропоновано новий інструмент для дослідження бактеріальних амілоїдів, який згодом було використано для дослідження різноманітних біоплівок, зокрема й патологічних біоплівок пародонту. Було проаналізовано здатність різних біоцидів, що використовуються у повсякденній практиці в українських лікарнях, до посилення контамінації простору генами антибіотикорезистентності та встановлено, які біоциди є найсильнішими факторами контамінації. Було встановлено унікальність структури патологічних біоплівок, що утворюються при пародонтиті, що дає змогу змінити парадигму лікування пацієнтів із хронічним пародонтитом. Було встановлено, що макролідний антибіотик азитроміцин здатний до пригнічення біоплівок звичайних та полірезистентних штамів *K. pneumoniae*. На основі цього феномену було розроблено принципово новий підхід для лікування полірезистентних інфекцій *K. pneumoniae*, який було успішно застосовано для лікування критично хворого пацієнта. Запропонований методи терапії внесено до локального стандарту операційних процедур (СОП) ряду лікарень і успішно застосовується в рутинній практиці для лікування важких полірезистентних грам-негативних інфекцій. Матеріали дисертації увійшли в навчальний посібник (Котов О.В., Корпусенко І.В., Міхно С.П., Мошинець О.В., Котов В.О. Основи антибактеріальної терапії та профілактики для хірургів. Навчальний посібник – Кривий Ріг: Видавець Чернявський Д.О., 2024, - 224 с., з іл.) та використовуються у навчальних курсах мікробіологічного та лікувального профілю для студентів медичних спеціальностей ВНЗ України та протягом курсів післядипломної медичної освіти. Запропоновано нову технологію праймування насінневого матеріалу і рослин продуктивних сортів з метою захисту від різноманітних комплексних стресорів та для підвищення врожайності.

Особистий внесок здобувача. Роботи здобувача, представлені в цій дисертації, засновані на результатах отриманих нею особисто, або за її безпосередньої участі чи під її керівництвом. Мету і задачі дослідження, а також висновки було сформульовано особисто. Огляд літератури, зокрема, аналіз біоплівок як форми бактеріальних агрегацій та аналіз робіт Виноградського було проведено разом з доктором Ендрю Спайрсом (Dr Andrew Spiers), університет Абертей Данді, Данді, Велика Британія). Вивчення ролі целюлози та екзоклітинної ДНК в культурах *Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp., *P. fluorescens* SBW25 також було проведено у співпраці із доктором Ендрю Спайрсом. Роль амілоїдогенезу в біоплівках грам-негативних бактерій було проведено разом із к.б.н. С. Черній під керівництвом д.б.н. В. Ковальської (відділ біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна). Роботи по дослідженню біоплівок при пародонтиті було проведено у співпраці із к.м.н. М. Слободяник-Коломоща та д.м.н. І. Мазур (кафедра стоматології НГУ імені Шупика, Київ, Україна). Роботи із

дослідження ефектів біоцидів і нових матеріалів із біоцидними властивостями було виконано у співпраці із к.х.н. С. Рогальським (лабораторія модифікації полімерів Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії імені В.П. Кухаря НАН України, Київ, Україна) і проф. Гіртом Поттерсом (Prof. Geert Potters), Морська академія Антверпену, Антверпен, Бельгія, а роботи із вивчення властивостей модифікованих металевих поверхонь з PhD Ярославом Гнилицьким, ТОВ “NoviNano lab”. Дослідження молекулярно-генетичних механізмів антибіотикорезистентності проведені у співпраці із майором доктором Скоттом Паллеттом (Dr Scott JC Pallett) з лікарні Челсі та Вестмінстеру Фонду NHS і Королівського центру оборонної медицини, Лондон, Велика Британія.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України в рамках різноманітних наукових проектів. Роботу було виконано в межах різних наукових проектів, зокрема, науково-дослідного проекту “Розробка біотехнології праймування пшениці на основі бактерійних сигнальних молекул класу ацилгомосеринлактонів для підвищення стійкості і врожайності” (№ держреєстрації 0115U004178) в рамках мультидисциплінарної програми НАНУ “Молекулярні та клітинні біотехнології для медицини, індустрії та аграрних наук” та науково-дослідної роботи “Вплив бактеріальних сигнальних молекул на врожайність та рослинні мікробні асоціації” у співпраці з Julius Kühn-Institut Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Німеччина (№ держреєстрації 0119U103436), прикладного біотехнологічного проекту «Розробка комплексного препарату комбінованої дії на основі похідних колагену для лікування раневих поверхонь» (№ держреєстрації 0120U101290), науково-технічної роботи 2020.02/0246 «Розробка комбінованої терапії важких *Klebsiella pneumoniae*-асоційованих нозокоміальних інфекцій для подолання їхньої антибіотикорезистентності» за підтримки НФДУ за програмою “Підтримка досліджень провідних та молодих учених” (№ держреєстрації 0120U104850), індивідуального гранту на дослідження за проектом “Etiology of extracellular DNA in pathogenic biofilms associated with periodontitis” що профінансовано програмою УНТЦ для стипендіальної програми віртуального залучення українських науковців (STCU program for Virtual Scientist Engagement Fellowship Program for Ukrainian Scientists) (Grant Agreement #2008-VSE) та проекту за програмою NATO Science for Peace and Security multi-year project SPS G6053 “Inhibition of Bacterial Settlement and Biofilm Formation through Physical Control of the Environment (PHYBI)” (№ держреєстрації 0124U002389).

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації доповідалися та обговорювалися на міжнародній конференції з мікробних біоплівки Biofilms 6, Відень, Австрія (2014); на шостому конгресі європейських мікробіологічних товариств FEMS2015, Маастріхт, Нідерланди (2015); на II міжнародній науково-практичній конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку у 21 столітті», Київ, Україна (2016); на 18-му міжнародному конгресі з морської корозії та обростання, Тулон, Франція (2016); на міжнародній конференції з мікробних біоплівки Biofilms 7, Порто,

Португалія (2016); на 27-му Європейському конгресі з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб 27th ECCMID, Відень, Австрія (2017); на 14-му симпозіумі з бактеріальної екології та генетики BAGECO 14, Абердин, Сполучене Королівство (2017); на сьомому конгресі європейських мікробіологічних товариств FEMS2017 Валенсія, Іспанія (2017); на 42-му конгресі Федерації європейських біохімічних товариств, Єрусалим, Ізраїль (2017); на щорічній конференції асоціації загальної та прикладної мікробіології VAAM, Вольфсбург, Німеччина (2018); на 28-му Європейському конгресі з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб 28th ECCMID, Мадрид, Іспанія (2018); на 17-му симпозіумі Міжнародного товариства мікробної екології ISME 2018, Лейпциг, Німеччина (2018); на 29-му Європейському конгресі з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб 29th ECCMID, Амстердам, Нідерланди (2018); на Setting our sights on infectious diseases Conference, Данді, Велика Британія (2019); на восьмому конгресі європейських мікробіологічних товариств FEMS2019, Глазго, Велика Британія (2019); на шостій спільній конференції DGHM & VAAM, Лейпциг, Німеччина (2020); на 32-му Європейському конгресі з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб 32th ECCMID, Лісабон, Португалія (2022); на всеукраїнській конференції з молекулярної та клітинної біології з міжнародною участю, присвячена героїчній боротьбі українського народу проти російських загарбників, Київ, Україна (2022); на воркшопі “Molecular basis of antibiotic permeability in Gram-negative bacteria”, Гамбург, Німеччина (2022); на 33-му Європейському конгресі з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб 33th ECCMID, Копенгаген, Данія (2023); 34-му Європейському конгресі з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб ESCMID-Global, Барселона, Іспанія (2024); дев'ята нарада в Тесінге з питань біоплівки щодо інфекцій, пов'язаних із біоматеріалом, Тесінге, Нідерланди (2024); конференція Eurobiofilms 2024, Копенгаген, Данія (2024).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 51 наукові роботи, з них 1 робота у науковому фаховому виданні України та 20 у закордонних наукових журналах, проіндексованих в міжнародних наукометричних базах даних Scopus і Web of Science, 30 тез доповідей на вітчизняних та закордонних наукових конференціях. Серед цих робіт: 11 експериментальних статей у журналах, що належать до Q1 SCImago; 4 експериментальних статей у журналах, що належать до Q2 SCImago; 2 експериментальні статті у журналах, що належать до Q3 SCImago та одна стаття у журналі з Q4 категорії SCImago; та три розділи монографій видавництв InTech Press і Nova Publisher.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота є кваліфікаційною науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей, викладена на 459 друкованих сторінках. Дисертація складається з наступних структурних підрозділів: вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів досліджень, основної частини, висновків, переліку використаних джерел та додатку. Розділами дисертації є публікації здобувача наукового ступеня в виданнях високого рівня. Список використаної літератури включає 1422 джерел, з яких

1250 є в публікаціях здобувача. Робота загалом містить 142 рисунка і 21 таблицю, опублікованих в працях здобувача.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень.

Робота з бактеріями. Усі штами зберігали при -80°C для тривалого зберігання у середовищі із додаванням 15% (об./об.) гліцерину до нічних культур. В роботі використали наступні штами: *Bordetella avium* 197N, *Escherichia coli* K12 DH5, *E. coli* K12 pC1-L, *P. fluorescens* SBW25 Wrinkly Spreader (WS), *P. fluorescens* SBW25 WS-GFP, *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031, *K. pneumoniae* UHI 117, *K. pneumoniae* UHI 486, *K. pneumoniae* UHI 489, *K. pneumoniae* UHI 509, *K. pneumoniae* UHI 519, *K. pneumoniae* UHI 520, *K. pneumoniae* UHI 329, *K. pneumoniae* UHI 1090, *K. pneumoniae* UHI 1609, *K. pneumoniae* UHI 1633, *K. pneumoniae* UHI 1667, *Streptococcus gordonii* UHI1, *S. sanguinis* UHI1, *S. mitis* UHI1, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Staphylococcus aureus* ATCC29423. Культивували при 20, 28, 37 і 42°C з використанням класичних середовищ із додаванням 1,5% агару для чашок Петрі і антибіотиків за потреби.

Визначення антимікробної чутливості. Для визначення антимікробної чутливості використовувався диск-дифузійний аналіз за Кірбі-Бауером, інтерпретація зон затримки росту виконувалась за EUCAST. Гени β -лактамаз виявляли методом ПЛР з використанням ДНК, очищеної за допомогою наборів AmpliSense DNA-sorb-B Nucleic Acid Extraction, MDR KPC OXA-48-FRT та MBL-FRT PCR kit (Медспілка, Україна).

Робота з біоплівками. Біоплівки відповідних бактерій отримували в скляних мікрокосмах об'ємом 30 мл, що містили 6 мл рідкого середовища, або в поліестринових плашках. Для виміру загального метаболізму біомаси біоплівки, асоційованої з поверхнею, використовували МТТ тест.

Дослідження еДНК. Біоциди тестували в різних концентраціях для визначення виходу еДНК. еДНК екстрагували з рідкої фази кожного зразка. Білки спочатку видаляли рівним об'ємом хлороформу, а ДНК осаджували 70% етанолом і 0,3 М ацетатом натрію (рН 8,0). Потім ДНК розчиняли в буфері TE. Концентрацію нуклеїнової кислоти вимірювали спектрофотометром NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Inc., Вілмінгтон, Делавер, США) та візуалізували за допомогою електрофорезу в 1,2% агарозному гелі та фарбування етидієм бромідом (EtBr).

Робота з еукаріотичними культурами. В роботі використовували лінію клітин нирки ембріона людини HEK293 і мезенхімальні/стромальні стовбурові клітини жирової тканини людини (ADSC).

Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія (CLSM). Мікроскопію зразків біоплівки проводили із використанням допомогою конфокальної системи Leica TCS SPE Confocal з кодованим інвертованим мікроскопом DMi8 (Leica, Wetzlar, Німеччина) та програмним забезпеченням Leica Application

Suite X версії 3.4.1 після фарбування відповідними барвниками та із відповідним налаштуванням прилада.

Флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH). Аналіз зразків біоплівки за допомогою FISH проводили із використанням олігонуклеотидних зондів для еубактерій, стрептококів і групи *Bacteroides–Porphyromonas–Prevotella* (BPP).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). ПЛР використовували для якісного та напівкількісного аналізу ключових збудників пародонту.

Композитні матеріали, що досліджувались. Для аналізу на формування біоплівок готувались і використовувались полімери ПА-11/ПГМГ-НС та комерційна суднова фарба РР-115 із додаванням іонної рідини РугС12-С1.

Робота з рослинами. В роботі використали два сорти озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) Володарка та Ятрань 60, розроблені Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України та Миронівським інститутом пшениці ім. В. М. Ремесла УААН. Насіння праймували в розчині 100 нг/мл С6-HSL (3 кг насіння / 10 л; приблизно 9 нг С6-ГСЛ на насіння) протягом 3 годин. Вивчали вплив праймування на схожість насіння, морфологічні параметри проростків, рівні хлорофілу і каротиноїдів, мікробіологічні параметри ризосфери проростків, структуру врожайності.

Статистичні методи. Кількісні аналізи проводили з повторами, і середнє значення зі стандартними помилками (SE) показано, де це необхідно. Дані аналізували за допомогою статистичного програмного забезпечення JMP v12 (SAS Institute Inc., США).

Результати досліджень та їхнє обговорення.

Структурні та екологічні особливості біоплівок грам-негативних бактерій. Біоплівка у широкому розумінні цього терміну є формою бактеріальної колонізації екониші (рис.1).

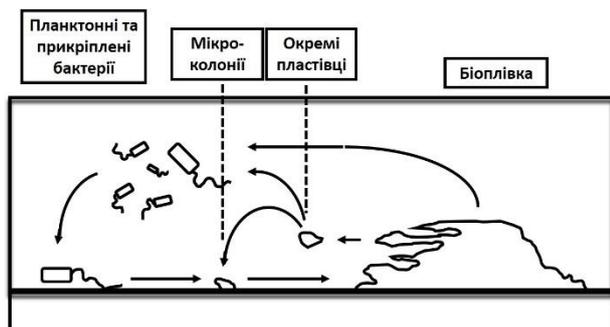
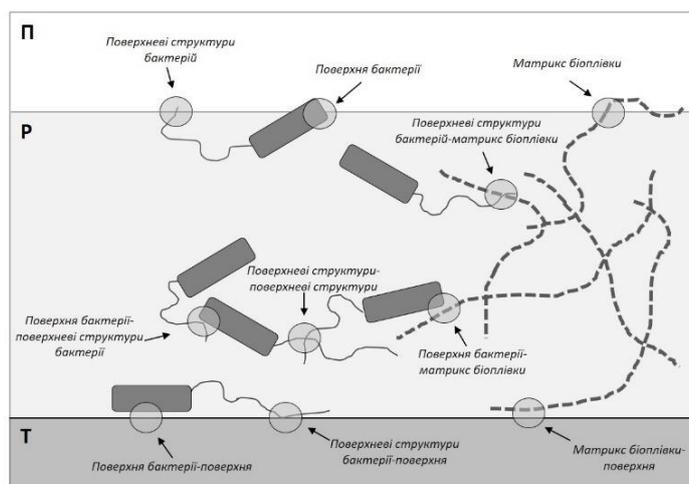


Рис. 1. Бактеріальні біоплівки є природною формою колонізації екониші бактеріями. Перебування бактерій, прикріпленої до субстрату, у біоплівці чергується з їх рухливим існуванням у формі планктону і залежить від сукупності умов, в яких популяція бактерій перебуває в кожний момент часу.

Структура біоплівки є відповіддю мікробної асоціації на різноманітність факторів екониші. Така екологічна пластичність дозволяє максимально поширювати ареал розповсюдження, стійкість до різноманітних стресорів та адаптацію до динамічних умов. Джерелом такої пластичності є широкий потенціал штамів бактерій до будування своїх біоплівок. В структурному відношенні біоплівки складаються з двох масивів компонентів: бактерій і екзотриптинного матриксу біоплівки (рис.2). Бактерії, що представляють біоплівову субпопуляцію, знаходяться в різних метаболічних станах і

координують свою метаболічну активність завдяки механізмам гормональної регуляції – почуття кворуму.



Компоненти матриксу або волокна художньо зображені пунктирними лініями, а бактерії – як бацили з одним джгутиком.)

Рис. 2. Бактеріальні природні агрегації, або біоплівки, утворюються шляхом численних та різноманітних фізичних взаємодій. Бактеріальні клітини всередині агрегацій взаємодіють одна з одною через близькі, проміжні та далекосяжні взаємодії, що включають поверхневі структури та видовжені відростки (наприклад, джгутики), компоненти матриксу, тверді поверхні та межі розділу (наприклад, межу розділу повітря-рідина). (Умовні позначення: П - повітря; Р - рідина; Т - тверде тіло;

Ці самі бактерії утворюють свою біоплівку завдяки синтезу різноманітних екзоклітинних полімерних молекул, які представляють собою так званий матрикс біоплівки. Співвідношення між екзополімерами матриксу та міжмолекулярні структурні зв'язки безпосередньо залежать і від синтетичних здатностей учасників біоплівки і від умов екологічної місцевості, де біоплівка будується. Саме тому біоплівки бактерій представляють собою результат комплексних просторових тривимірних молекулярних взаємодій різноманітних компонентів, які синтезуються учасниками біоплівки (Hobley et al., 2015; Payne, & Boles, 2016; Ruhul & Kataria, 2021). До головних компонентів матриксу біоплівок грам-негативних бактерій відносяться полісахариди, так як, наприклад, PNAG у *K. pneumoniae* і *Acinetobacter baumannii* (Chen et al., 2014; Singh et al., 2019), Psl, Pel і альгінат у *P. aeruginosa* (Colvin et al., 2012; Irie et al., 2012), ліпоолігосахариди і капсульні полісахариди у *A. baumannii* (29), целюлоза у *Enterobacter cloacae* та у псевдомонад (Zogaj et al., 2003). Інший важливий компонент матриксу біоплівок – функціональні амілоїди, наприклад, Вар і CSu пілі у *A. baumannii* (Goh et al., 2013; Pakharukova et al., 2018), FapC у *P. aeruginosa* (Javed et al., 2020), так звані curli фімбрії у *E. cloacae* (Kim et al., 2012; Qian et al., 2021). Особливу роль у первинній адгезії бактерій, цементуванні матриксу біоплівки і у депонуванні еволюційно успішної генетичної програми, вірогідно, відіграє екзоклітинна ДНК, або eДНК, яка широко представлена в біоплівках і грам-позитивних (Rice et al., 2007; Paganelli et al., 2015) і грам-негативних бактерій (Allesen-Holm et al., 2006; Mulcahy et al., 2007; Sahu et al., 2012; Desai et al., 2019; Qian et al., 2021).

Роль целюлози у структурі біоплівок *Pseudomonas spp.* Вперше бактеріальна целюлоза була виділена з біоплівки, що утворилась на поверхні рідини, це так звані біоплівки інтерфазі П-Р (повітря-рідина), бактерією *Bacterium xylinum* у 1886 році (Brown, 1886). Цей штам оцтовокислої бактерії, ймовірно, тепер має бути ідентифіковано як *Gluconacetobacter xylinus* (раніше

Acetobacter xylinum) або споріднений вид. Протягом наступного століття було виявлено більше оцтовокислих бактерій та бактерію *Proteobacter* які продукують целюлозу (Brown, 1989; Ross et al., 1991). До групи целюлозоутворюючих бактерій відносять різні коменсали кишечника, патогени рослин і тварин, зокрема родини *Clostridiaceae*, альфа-протеобактерії *Rhizobiaceae* і *Acetobacteraceae*, бета-протеобактерії *Alcaligenaceae* та гамма-протеобактерії *Enterobacteriaceae* і *Pseudomonadaceae*. Цікаво тут те, що всі ці бактерії здатні для існування у ґрунті як у загальному вторинному середовищі існування. Ймовірно, що целюлоза забезпечує захист від механічного впливу, хижаків або інших екологічних стресів, які можуть мати місце у вищезгаданих різноманітних середовищах. Біохімічні та генетичні аспекти продукції бактеріальної целюлози широко вивчені для *Gluconacetobacter*, далі класичний оперон синтеза целюлози *bcs* було використано як модель для дослідження механізмів продукції целюлози кишковими бактеріями і псевдомонадами (Solano et al., 2002; Spiers et al., 2002).

Одним із добре досліджених продуцентів целюлози є асоційована з рослинами псевдомонада *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (Rainey et al., 1996; Rainey & Travisano, 1998; Silby et al., 2009). Ця бактерія також добре відома як модельна для дослідження еволюції. Підвищення продукції целюлози у цій бактерії внаслідок адаптативної еволюції призводить до появи нового адаптивного мутанту, що утворює супербіоплівки. Цей штам відомий як Wrinkly Spreader (WS). Втім, екологічна роль целюлози та переваги, які вона надає, все ще не вивчені.

Роль целюлози у структурі біоплівок *Bordetella* spp. *Bordetella avium* - збудник бордетеллезу (трахеобронхіт), який викликає дуже заразне захворювання верхніх дихальних шляхів хвороб домашніх і диких птахів (Hinz & Glunder, 1985; Raffel et al., 2002; Grespan et al., 2012). *B. avium* також є умовно-патогенним мікроорганізмом людини, який також може бути пов'язаний з муковісцидозом (Spilker et al., 2008; Harrington et al., 2009; Bos et al., 2011). *B. avium* філогенетично відрізняється від *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis* та *Bordetella pertussis*, які є респіраторними збудниками ссавців, хоча *B. avium* експресує подібні фактори вірулентності, а також продукує біоплівки. Питання який матриксовий полімер є головним при утворенні біоплівки бордетелою під час інфікування господаря або при колонізації інших транзиторних екологічних ніш залишається відкритим.

Було з'ясовано, що в анотованому геномі *B. avium* 197N (Sebahia et al., 2006) є потенційна бактеріальна синтаза целюлози (*bcs*) оперон (гени BAV2632-2623). Проаналізувано феноменологію оперонів *Bcs* (рис. 3) та ідентифікувано їх в геномах широкого спектру протеобактерій, але експресія целюлози була підтверджена для відносно небагатьох штамів, серед яких патогени і коменсали шлунково-кишкового тракту людини, а також псевдомонади, що асоційовані із ґрунтами і рослинами (Romling et al., 2002; Spiers et al., 2013; Romling et al., 2015).

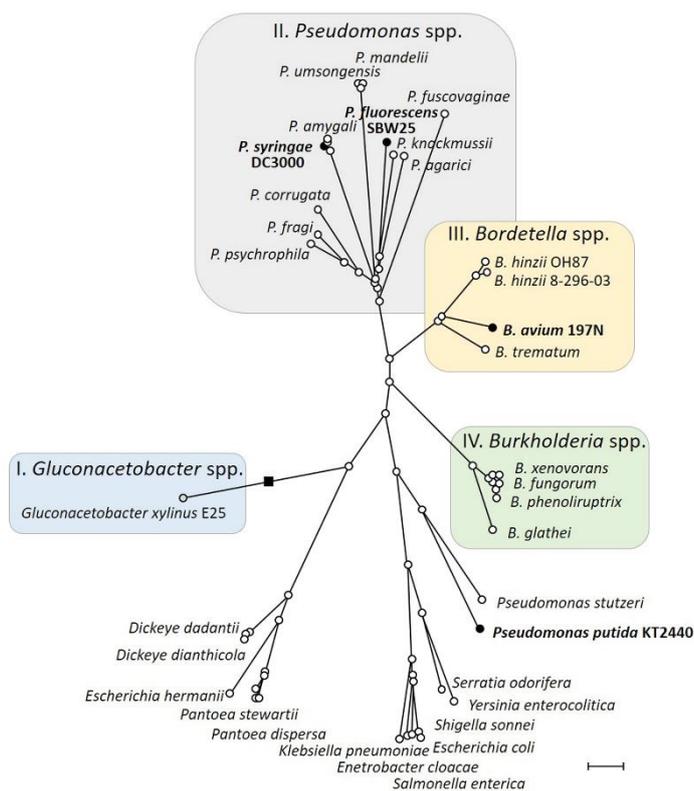


Рис. 3. Філогенетичний аналіз репрезентативних гомологів WssB. Філогенетичне дерево, що показує зв'язки між білками WssB з ключових штамів *B. avium* 197N, *P. fluorescens* SBW25, *P. putida* KT2400 та *P. syringae* DC3000 (жирним шрифтом), а також низки інших бактерій, у яких були ідентифіковані wss-подібні bcs-оперони. Шкала відстані показує 0,1 одиниці.

Цікаво, що субодиниці оперону *bcs* у *B. avium* 197N демонструють близьку амінокислотну послідовність з тими, що містяться в псевдомонадах, зокрема штамом *P. fluorescens* SBW25, що асоційований із ґрунтом і рослинами (анотований як *wssA-J*,

PFLU0300-0309), незважаючи на те, що *Bordetellae* і *Pseudomonas* віддалено споріднені роди. Оперони *B. avium* 197N і *P. fluorescens* SBW25 *bcs* також подібні через включення субодиниць, що відповідають за ацетилювання целюлози. Такі субодиниці спочатку описані для *P. fluorescens* SBW25 (WssF-I). Порівняння послідовностей білків субодиниць і аналіз вмісту GC підтверджує велику подібність між *B. avium* 197N і оперонами псевдомонад, що дає змогу припустити, що в обох випадках субодиниці синтази целюлози та субодиниці ацетилювання були придбані як одна одиниця.

З'ясовано, що *B. avium* 197N використовує целюлозу як один з інструментів екологічної стратегії виживання в різноманітних середовищах існування. Низький рівень експресії целюлози у зразках біоплівки *B. avium* 197N дикого типу спостерігався в рідкій та агаризованих культурах. Сконструйовано мутант з дефіцитом продукції целюлози (CD) і продемонстровано, що целюлоза не є критичним компонентом матриксу біоплівки, що свідчить про те, що *B. avium* 197N використовує для цієї мети інший неідентифікований екзополімер. Таким чином встановлено, що *B. avium* 197N експресує низькі рівні целюлози в біоплівках, що утворюються на повітряно-рідинному інтерфазі, і що міцність біоплівки та рівень прикріплення можна збільшити шляхом підвищення рівнів c-di-GMP, як у псевдомонад, але целюлоза не потрібна для утворення самої біоплівки.

Роль екзоклітинної ДНК, амлоїдних фібрил і мембранних везикул у біоплівці *P. fluorescens* SBW25. Бактеріальні біоплівки є складними структурами, що використовують різні полімери в якості структурних елементів. До матриксу досліджених біоплівок грам позитивних і грам-негативних бактерій майже завжди входить екзоклітинна ДНК (Rice et al., 2007;

Allesen-Holm et al., 2006; Mulcahy et al., 2007; Sahu et al., 2012; Paganelli et al., 2015; Desai et al., 2019; Qian et al., 2021). еДНК бере участь у клітинній адгезії на ранніх стадіях розвитку біоплівки та відіграє ключову структурну роль у зрілих біоплівках (Okshevsky & Meyer, 2015; Jakubovics et al., 2013; de Aldecoa et al., 2017; Campoccia et al., 2021; Vandana, 2022).

Біоплівка суперпродуценту целюлози *P. fluorescens* SBW25 Wrinkly Spreader є дуже міцною в'язкопружною структурою в порівнянні із слабшою біоплівкою Viscous Mass, яка утворюється диким типом *P. fluorescens* SBW25. Така більша міцність може бути пов'язана із тим фактом, що у біоплівці Wrinkly Spreader целюлозні волокна взаємодіють з іншими недослідженими компонентами. Для розуміння структурної ролі еДНК в біоплівках *P. fluorescens* SBW25 було ізолювано і виміряно еДНК та проаналізувано міцності біоплівок під впливом ДНКаз, яку додавали у мікрокосм або наносили на сформовану біоплівку безпосередньо (рис. 4). Таким чином було показано суттєву різницю між вмістом еДНК в різних біоплівках, а також між планктонними та біоплівковими популяціями. Додавання ДНКаз не вплинуло на міцність біоплівки Viscous Mass, але суттєво змінювало міцність біоплівки Wrinkly Spreader, що доводило важливу роль еДНК в її формуванні.

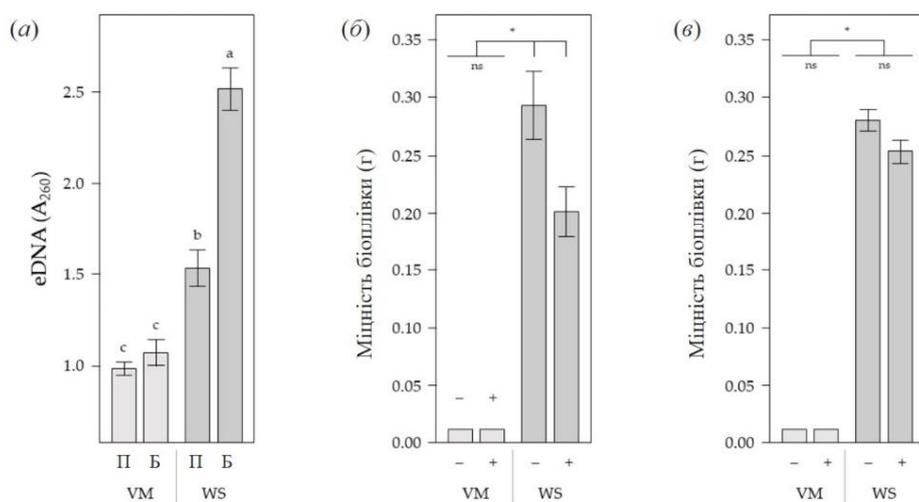


Рис. 4. Кількісне вимірювання еДНК та її вплив на міцність біоплівок *P. fluorescens* SBW25. Для вимірювання еДНК, виділеної з планктонних культур та біоплівок, використовували спектрометрію, а для визначення міцності біоплівки – невеликі скляні кульки. Рівні

еДНК (A 260) (а) у 24-годинних планктонних (П) та триденних зразках біоплівки (Б). Міцність вимірювали у (б) триденних біоплівок, які розвивалися в мікрокосмах з ДНКазою I перед аналізом та (в) у триденних біоплівок, оброблених ДНКазою I протягом 3 годин перед аналізом (+, з; -, без); VM - Viscous Mass; WS - Wrinkly Spreader). Показано середні значення ($n = 6-8$) \pm SE. Середні значення, позначені зірочкою, суттєво відрізняються ($p < 0,05$) (ns, суттєво не відрізняються).

Також, було досліджено вплив низькомолекулярної і високомолекулярної ДНК на механічні властивості біоплівок Wrinkly Spreader і вихідного штаму Viscous Mass (рис. 5). Аналіз отриманих даних показав, що є відмінності у реакції на екзогенну ДНК біоплівками Wrinkly Spreader та Viscous Mass. Зокрема, високомолекулярна ДНК негативно впливала на розвиток біоплівок Wrinkly Spreader, зменшуючи міцність та рівень прикріплення (рис. 5 б-в), не впливаючи на кінцевий рівень біомаси (рис. 5 а). Навпаки, високомолекулярна

ДНК збільшує кінцеву біомасу Viscous Mass, можливо, додатково стимулюючи розвиток біоплівки, хоча це не підтверджується суттєво збільшеними вимірюваннями міцності або рівнем прикріплення біоплівки.

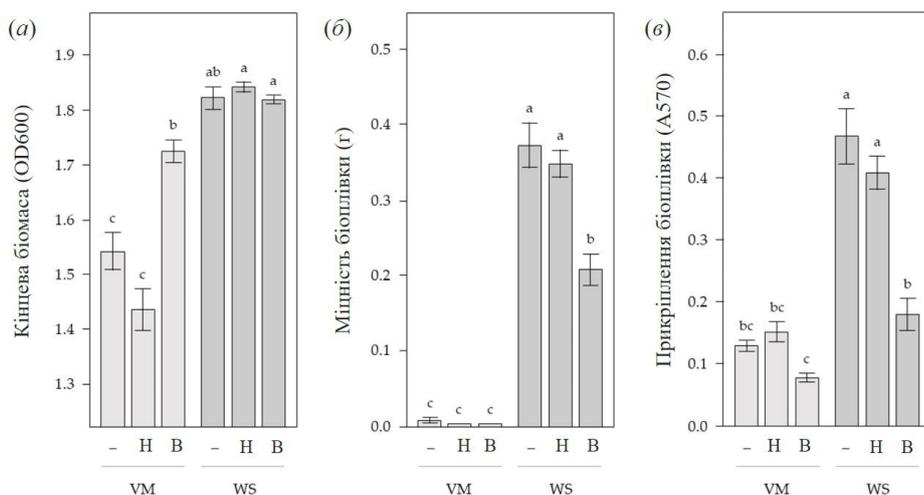


Рис. 5. Екзогенна ДНК впливає на розвиток біоплівок *P. fluorescens SBW25*. До мікрокосмів додавали низькомолекулярну (Н) та високомолекулярну (В) ДНК, біоплівки VM (Viscous Mass) та WS (Wrinkly Spreader) залишали

розвиватися протягом трьох днів перед аналізом. Показано середні значення ($n = 8-24$) \pm SE. Середні значення з однаковою літерою суттєво не відрізняються ($\alpha = 0,05$).

Окрім ролі ДНК різної молекулярної маси було встановлено високу представленість функціонального амілоїдогенезу в обох біоплівках *P. fluorescens SBW25*. Також, з біоплівки та планктону Wrinkly Spreader було ізольовано мембранні везикули (рис. 6) та ізольовано білковий компонент матриксу біоплівки. Білковий вміст везикул і матриксу було якісно порівняно за допомогою MALDI-TOF/MS (рис.7).

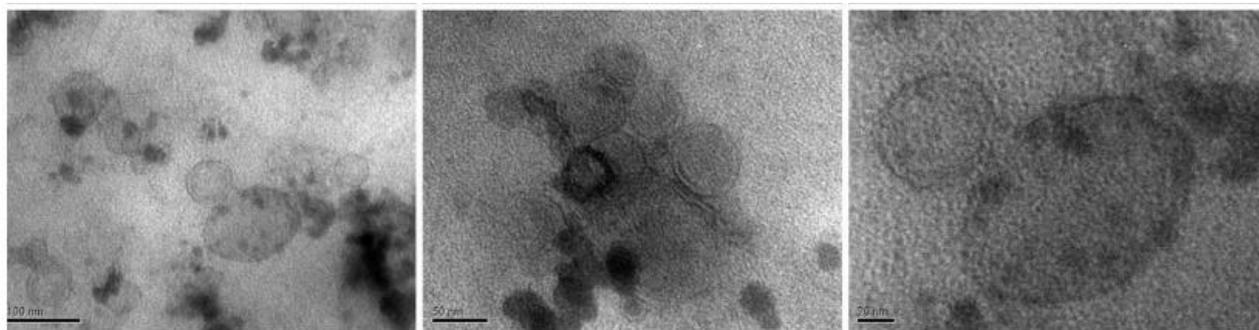


Рис. 6. Три зображення мембранних везикул, виділених з триденних біоплівок *P. fluorescens SBW25 Wrinkly Spreader*. Масштабні смуги позначають 100 нм, 50 нм та 20 нм (зліва направо). Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ).

Таким чином, представленні дослідження нових аспектів біоплівок Wrinkly Spreader і Viscous Mass потребують перегляду класичної моделі утворення цих біоплівок, оскільки було виявлено, що еДНК та амілоїдні фібрили сприяють розвитку та формуванню структури біоплівок. Продемонстровано, що еДНК та амілоїдні волокна також присутні в біоплівках

P. fluorescens SBW25, а еДНК відіграє структурну роль у ранньому розвитку, принаймні у фізично більш міцній біоплівці Wrinkly Spreader.

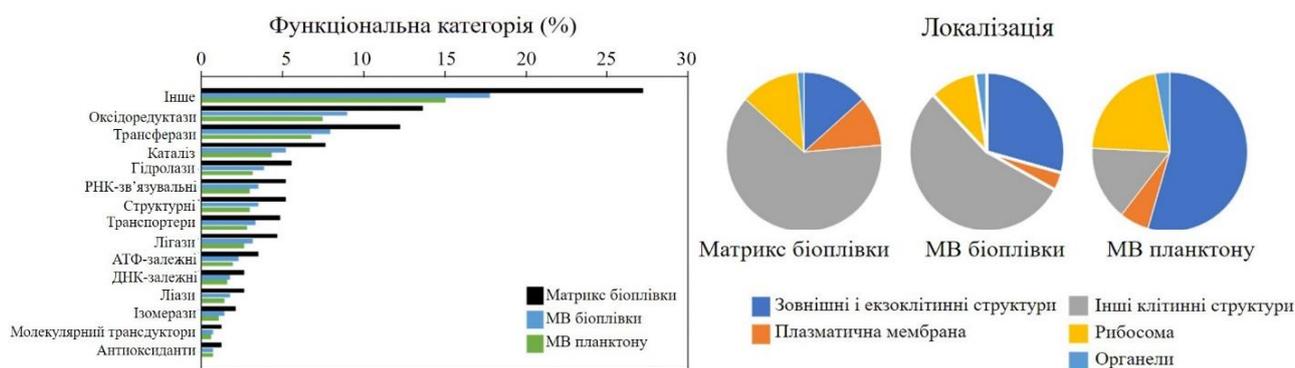


Рис. 7. Порівняльний аналіз функціональних груп білків матриксу біоплівки *P. fluorescens* SBW25 Wrinkly Spreader та білковий склад мембранних везикул (МВ).

Однак, на відміну від біоплівок *P. aeruginosa*, де еДНК в першу чергу відповідає за в'язкопружні властивості, еДНК в *P. fluorescens* SBW25 відіграє вторинну роль по відношенню до целюлози, яка є основним матриксом і структурним компонентом цих біоплівок *P. fluorescens* SBW25.

Роль амілоїдогенезу в біоплівках грам-негативних бактерій. Амілоїди це високовпорядковані білкові агрегати з нерозгалуженою ниткоподібною структурою. Функціональний амілоїдогенез широко поширений в бактеріальних біоплівках, де амілоїди сприяють початковому прикріпленню та агрегації та формують матрикс біоплівки (Dueholm et al., 2013; Serraet al., 2013). Для більш специфічного дослідження бактеріальних амілоїдів було розроблено і досліджено новий амілоїд-чутливий барвник AmyGreen, який виявився чутливішим за класичний Thioflavin T (ThT) (рис. 8).

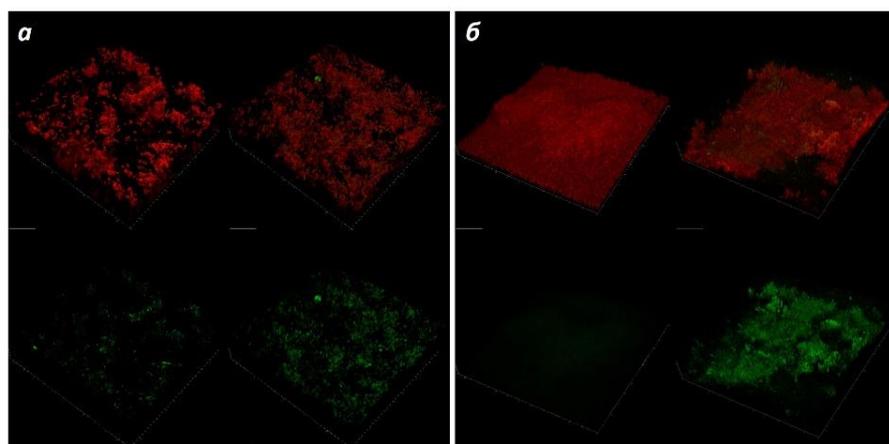


Рис. 8. Одноденна біоплівка *K.pneumoniae* ATCC10031 (а) та госпітального ізоляту *K. pneumoniae* UHI117 (б), забарвлення EtBr/ThT (ліворуч) та EtBr/AmyGreen (праворуч). Червоний колір відповідає емісії EtBr, зелений — AmyGreen або ThT.

Цим новим флуоресцентним барвником було досліджено амілоїдний компонент у матриксу низки біоплівок, зокрема, в біоплівках *K. pneumoniae* ATCC10031, колекції патогенних ізолятів *K. pneumoniae* (рис. 9), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (рис. 10 а) і *B. avium* 61 (рис. 10 б).

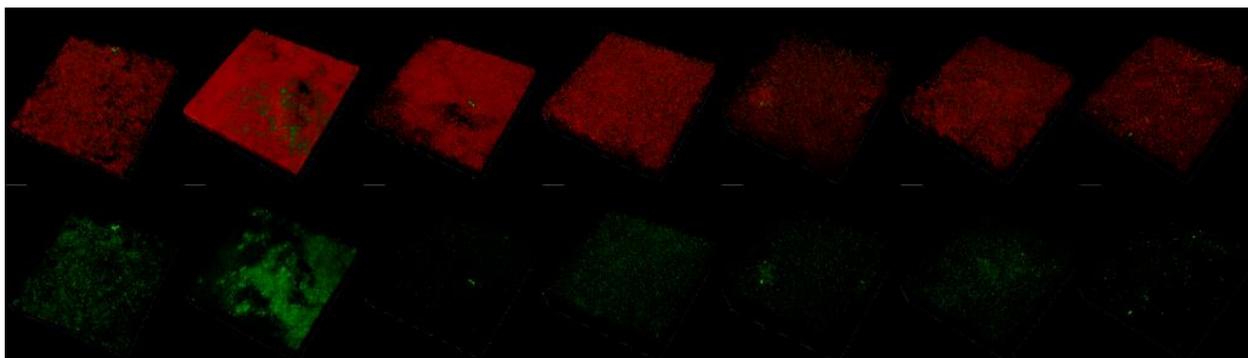


Рис. 9. Триденні біоплівки різних штамів *K. pneumoniae*, забарвлені EtBr та AmyGreen (зверху) та AmyGreen (знизу). Зліва направо: *K. pneumoniae* ATCC10031, UHI117, UHI496, UHI509, UHI519, UHI520, UHI742.

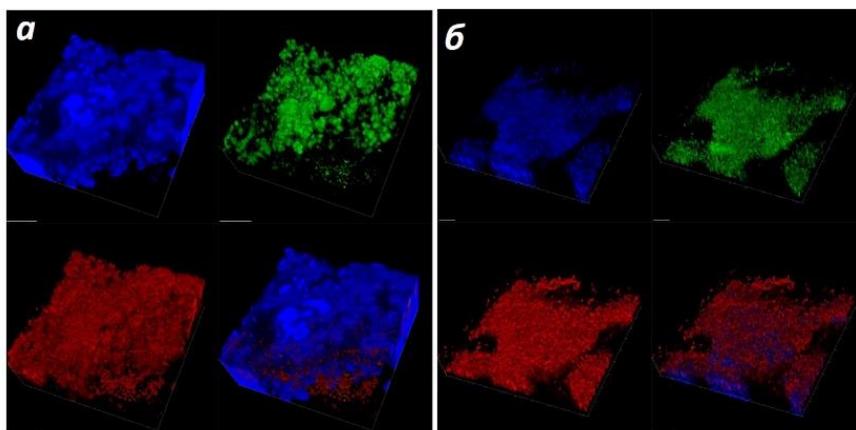
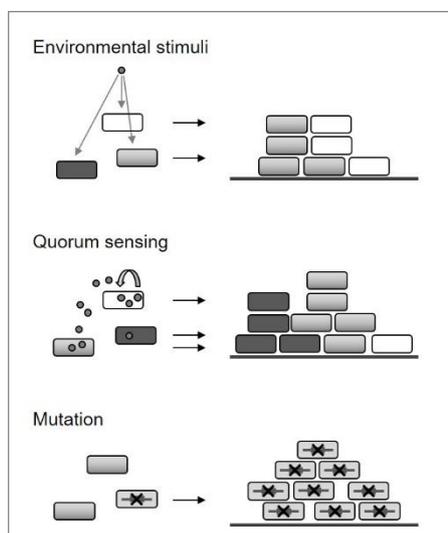


Рис. 10. П'ятиденні біоплівки *P. aeruginosa* ATCC27853 (а) і *B. avium* 61 (б), забарвлені Calcofluore White (CW) (синій), AmyGreen (зелений) та EtBr (червоний). Масштабна шкала відповідає 20 мкм.

Фізіологічна роль почуття кворуму у *P. fluorescens* SBW25. Утворення біоплівок є прикладом співпраці асоціації бактерій, хоча співпраця завжди врівноважується динамічною конкуренцією всередині асоціації. В багатьох випадках утворення біоплівки контролюється регуляцією почуття кворуму (ПК), який представляє собою форма бактеріальної комунікації через малі дифузійні сигнальні молекули, в яких усі члени спільноти інвестують і отримують користь однаковою мірою (Galloway et al., 2011; Coggan et al., 2012; Stacy et al., 2012; Garg et al., 2014). Загалом, можливі три шляхи, що ведуть до утворення біоплівок. Біоплівки можуть бути результатом утворення спільнот



бактерій, які реагують на однакові стимули навколишнього середовища (зверху), регуляцію кворум-сенсингу (QS), або почуття кворуму (ПК) (посередині) або мутацію (знизу) (рис. 11).

Рис. 11. Концептуальні шляхи утворення біоплівок.

Суперпродуцентний мутант Wrinkly Spreaders (WS) було розглянуто як клас адаптивних мутантів, який виникає під час експериментальної еволюції популяції *P. fluorescens* SBW25 у статичному мікрокосмі. Основні молекулярні механізми функціонування

Wrinkly Spreaders пов'язані із мутаціями, що викликають збільшення внутрішньоклітинного c-di-GMP, що призводить до посиленого виробництва целюлози та посилення утворення біоплівки. Огляд геному *P. fluorescens* SBW25 виявив потенційний ПК-залежний регуляторний шлях та інші ПК-залежні гени, пов'язані з гомеостазом c-di-GMP.

Роль біоплівок у розвитку інфекційних ускладнень. Утворення біоплівки є бактеріальною стратегією колонізації різноманітних екологічних ніш (Moshynets & Spiers, 2016). Утворення біоплівок є центральним етапом у розвитку багатьох інфекційних процесів. Більш того, сама біоплівка може бути терапевтичною мішенню у новій комбінації антибіотиків проти антибіотикорезистентних грам-негативних бактерій.

Патогенез опосередкований біоплівками як результат взаємодії патогенів з імунною системою хазяїна при пародонтиті. Захворювання пародонту визнано наслідком інфекції та запалення ясен і кісткової тканини, що асоційована із зубами. Вважається, що пародонтит відбувається в тісній асоціації з агресивною колонізацією бактерій і патогенними утворення біоплівки. Мікробіологічно індуковані запальні процеси, що лежать в основі пародонтиту, відбуваються в під'ясенній ніші. Однак більшість досліджень пародонтиту, включаючи аналіз зубного каменю, зосереджувалися на над'ясенній ділянці, і існує мало інформації про під'ясенну нішу та структуру мікроландшафтів під час пародонтиту. Було проведено порівняльний аналіз складу полімерів під'ясенних біоплівок та вирощених *in vitro* одновидових біоплівок, включаючи три ізоляти стрептококів ротової порожнини. Встановлено, що головним біоплівковим полімером є еДНК, а найменш представленим полімером є амілоїди фібрили (рис. 12).

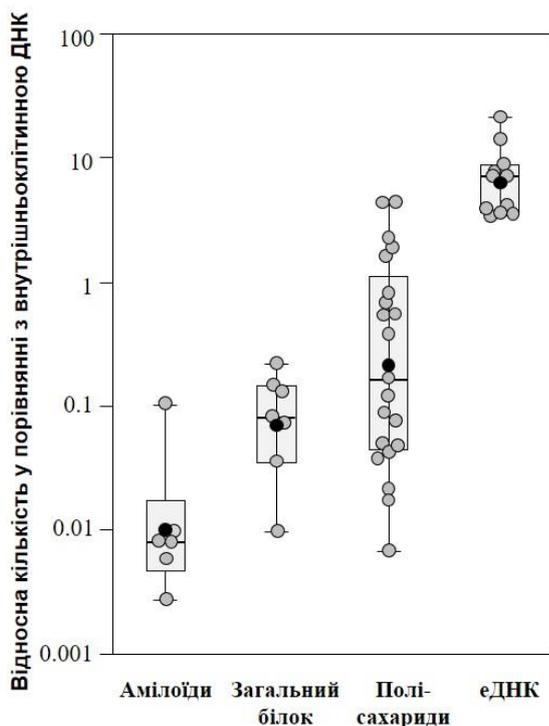


Рис. 12. Кількісне визначення біомаси позаклітинних полімерів у субгінгівальних біоплівках виміряно як сума пікселів в 3D CLSM-зображеннях. Зображено відносну кількість амілоїдів, загального білка, полісахаридів та клітин *Candidia* та еДНК порівняно з рівнями внутрішньоклітинної ДНК (вДНК) в субгінгівальних біоплівках, відібраних у чотирьох пацієнтів. Зразки були додатково розділені на підзразки, щоб дозволити забарвлення кількома барвниками. Амілоїди забарвлювали AmyGreen, загальний білок – Thiazine Red R, вуглеводи та клітинини *Candidia* – CW, еДНК – Propidium Iodide (PI), а вДНК – EtBr або SYBR Green.

Для оцінки такого розподілу полімерів в матриці біоплівки показники відносного вмісту еДНК і амілоїдів було порівняно із відповідним вмістом в модельні моно-біоплівки, отримані *in vitro* (рис. 13).

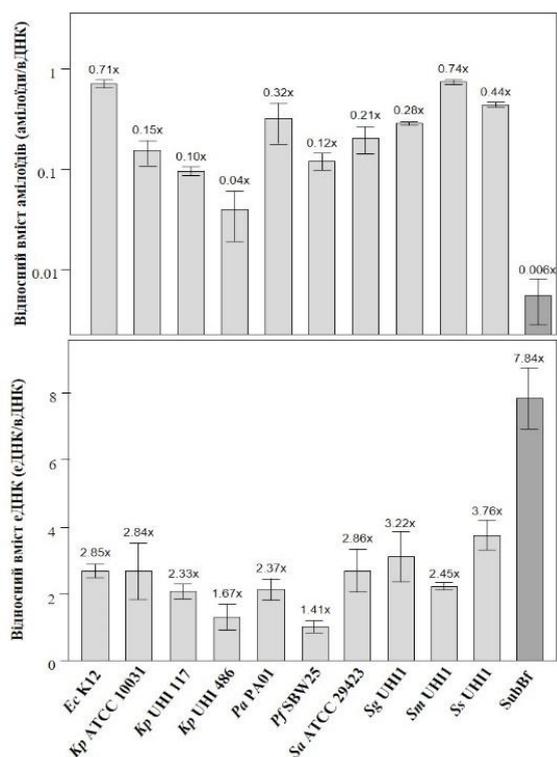


Рис. 13. Рівні біомаси ампліоїдів (зверху) і еДНК (знизу) в триденних одновидових біоплівках порівняно з під'ясеними біоплівками (SuBf) виміряно як сума пікселів в 3D CLSM-зображеннях. Визначено відносну кількість ампліоїдів та еДНК до вДНК, в біоплівках *E. coli* K12, *K. pneumoniae* ATCC 10031, двох внутрішньолікарняних ізолятів *K. pneumoniae* UHI 117 та UHI 486, *P. aeruginosa* PA01, *P. fluorescens* SBW25, *S. aureus* ATCC 29423 та трьох патогенних стрептококів *S. gordonii* UHI1, *S. sanguinis* UHI1, *S. mitis* UHI1, отриманих з запалень в ротовій порожнині.

Було продемонстровано, що в під'ясених біоплівках ампліодний генез знижений, а еДНК виявилася основним компонентом матриці біоплівки, що є нетиповим. Для виміру кількості нативної ДНК біоплівки було використано ДНКазу, яку додавали до

зразку п'ясенної біоплівки та інкубували протягом 20 хвилин. З'ясовано, що внесок еДНК в загальний мікроландшафт під'ясенної біоплівки мог складалати до 90% всього ДНК-сигналу (рис. 14).

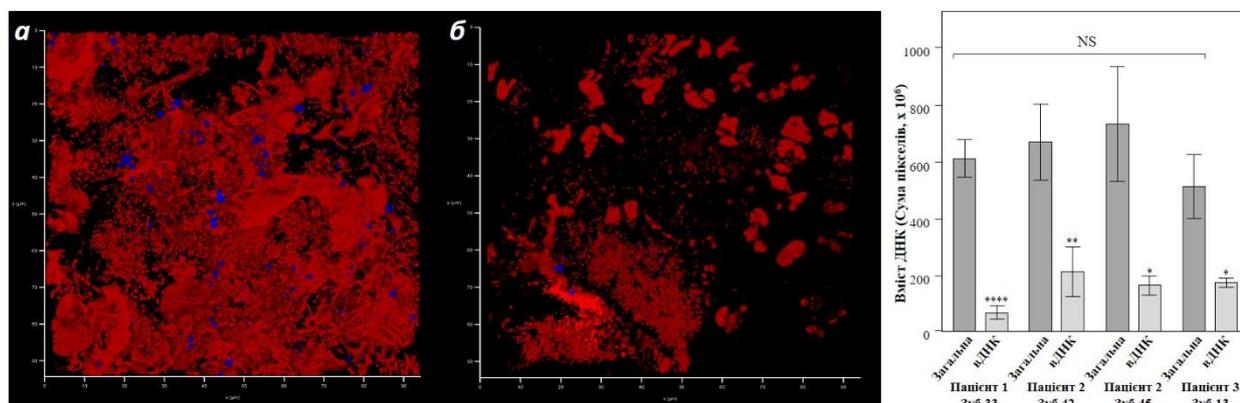


Рис. 14. Ліворуч: під'ясенні мікроландшафти, що розвиваються на ПЕТ-плівках під час пародонтиту, чутливі до обробки ДНКазою. Під'ясенна біоплівка, отриманої за допомогою ПЕТ-плівки та зображеної за допомогою CLSM, із загальною ДНК, забарвленою EtBr та PI (червоний канал), та клітинами *Candida* за допомогою CW (синій канал) до (а) та після обробки ДНКазою (б). Праворуч: обробка ДНКазою демонструє, що значна частина біомаси ДНК, що візуалізована в під'ясених біоплівках, є екзоклітинною ДНК (еДНК). Рівні біомаси ДНК в під'ясених біоплівках, що розвиваються в зубних кишнях на ПЕТ-плівках, виміряно як сума пікселів в 3D CLSM-зображеннях.

Для візуалізації тонких взаємодій під'ясених біоплівок з імунною системою хазяїна *in vivo* було застосовано новий експериментальних барвник 986, що є високочутливим до еДНК через високу молекулярну масу (рис. 15).

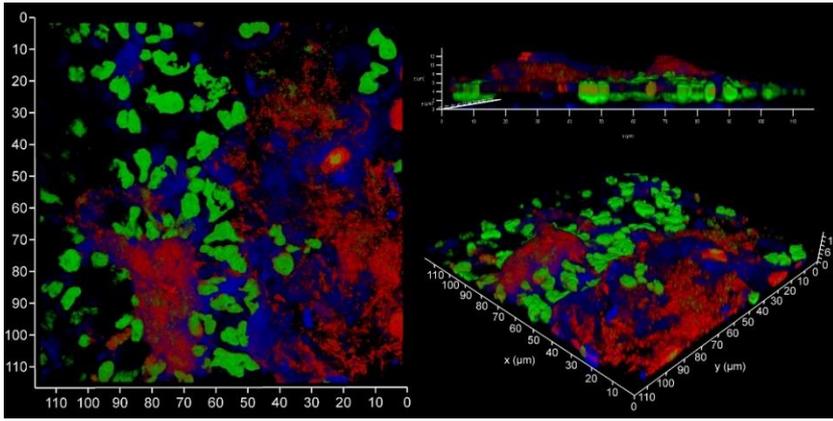


Рис. 15. Під'ясенні мікроландшафти під час пародонтиту. CLSM, вДНК забарвлена SYBR Green (зелений канал), еДНК забарвлена барвником 986 (червоний канал), *Candida* забарвлені CW (синій канал).

Щоб оцінити внесок еДНК, отриманої від

хазяїна та бактерій, проведено флуоресцентну гібридизацію *in situ* (FISH) під'ясених мікробних ландшафтів, сформованих на ПЕТ-плівках, використовуючи специфічний для бактерій зонд EUB 338 (Рис. 16). FISH-аналіз субгінгівальних мікроландшафтів, відібраних під час захворювань пародонту, показав, що еДНК хазяїна була доміантною, лише 8–21% від загальної кількості продукувалося пародонтними патогенами.

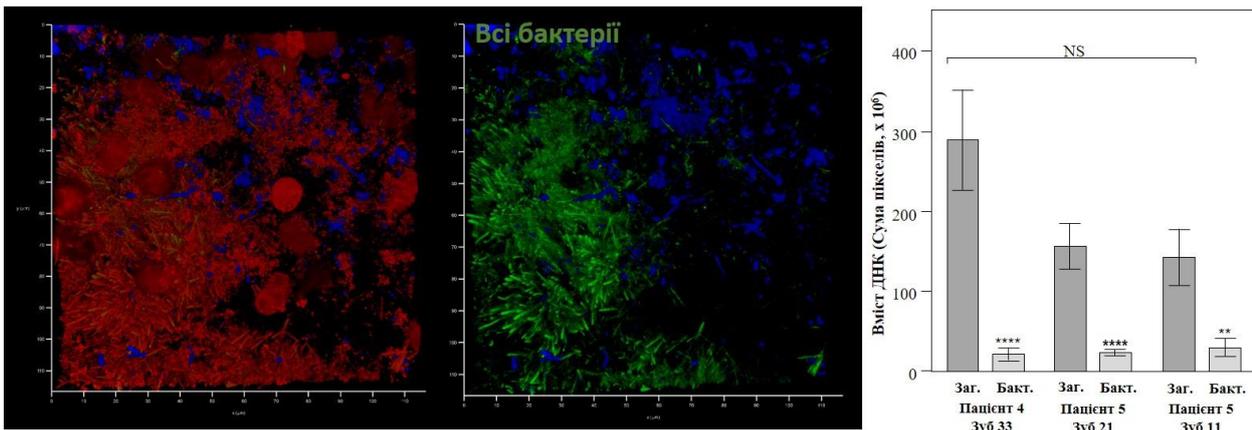


Рис. 16. Ідентифікація бактеріальної еДНК за допомогою FISH, де фарбування бактеріальної еДНК відбувалось зондом EUB 338, міченим FITC (зелений канал), візуалізація загальної еДНК через забарвлення PI (червоний канал), а клітини *Candida* візуалізувались за допомогою CW (синій канал) (ліворуч). Загальний рівень біомаси еДНК (Заг.) та бактеріальної еДНК (Бакт.) виміряно як сума пікселів в 3D CLSM-зображеннях під'ясених біоплівках, забарвлених PI та EUB 338 (праворуч).

Основним джерелом еДНК хазяїна, ймовірно, є імунокомпетентні клітини, активовані після пародонтиту, і тому є основним фактором персистенції та патогенезу, тоді як еДНК з груп *Bacteroides–Porphyromonas–Prevotella* та оральних стрептококів свідчить про те, що вони можуть бути найважливішими біоплівкоутворювачами під час захворювань пародонту.

Біоплівки *K. pneumoniae* як форма інфекційного процесу та комбінована анти-біоплівкова терапія клебсієльозів. Резистентність до антибіотиків є однією з найсерйозніших загроз людству. Російська війна проти України різко вплинула на антибіотикорезистентність на місцевому та національному рівнях (Kondratiuk et al., 2020; Melwani, 2022; Berger et al., 2023; Ljungquist et al., 2023) та різко поширила розповсюдження резистентних MDR (multidrug-resistant), майже повністю резистентних, або XDR (extensively drug-resistant) штамів, та резистентних до всіх лікарських засобів PDR (pandrug resistant) штамів. PDR бактерії є стійкими до всіх доступних антибіотиків, тому інфекції, які вони викликають, не мають стандартних терапевтичних підходів для лікування. Часто єдиним антибіотиком, до якого ще зберігається чутливість у XDR штамів, є колістин, який не має достатнього терапевтичного ефекту і за рекомендаціями EUCAST має бути застосований з іншим антибіотиком, до якого теж зберігається чутливість. Було досліджено можливість використання антибіотику із антибіоплівковим механізмом дії у комбінації з колістином для підсилення його терапевтичного потенціалу по відношенню до високорезистентних штамів клебсієл. Для первинної оцінки здатності макролідних антибіотиків до пригнічення розвитку біоплівок було досліджено антибіоплівковий ефект наявних на українському фармринку макролідних антибіотиків проти біоплівки *K. pneumoniae* (рис. 17).

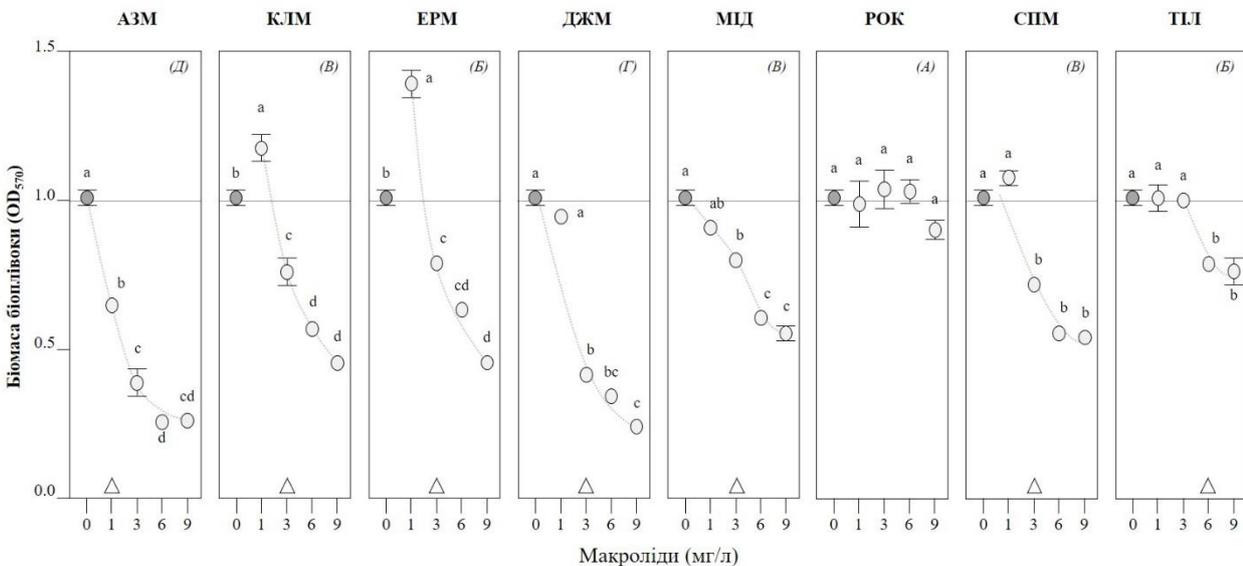


Рис. 17. Рівні біомаси біоплівок *K. pneumoniae* ATCC10031 в присутності різних концентрацій макролідів, де АЗМ – азитроміцин, КЛМ – кларитроміцин, ЕРМ – еритроміцин, ДЖМ – джозаміцин, МІД – мідекаміцин, РОК – рокситроміцин, ТЛІ – тілозин. Середні значення, не з'єднані однаковими літерами в межах панелей, суттєво відрізняються (LSMeans Differences Tukey HSD, альфа = 0,05).

Для подальших досліджень обрано азитроміцин, який ефективно пригнічував розвиток модельної біоплівки і мав парентеральну форму (рис. 18).

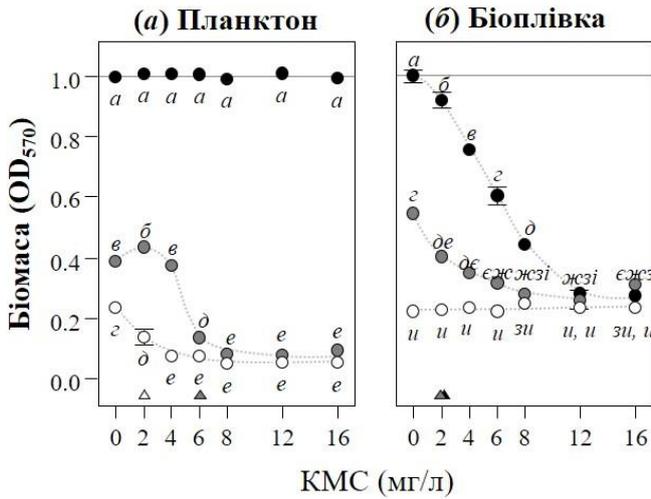


Рис. 18. Рівні біомаси планктону (а) та біоплівки (а) *K. pneumoniae* ATCC10031 під впливом колістину (КМС), контроль (без азитроміцину) - темні кола, 3 мг/л азитроміцину – сірі кола та 9 мг/л азитроміцину – білі кола. Середні значення, не з'єднані однаковими літерами в межах панелей, суттєво відрізняються (LSMeans Differences Tukey HSD, альфа = 0,05).

Порівнянно взаємний вплив азитроміцину і колістину на різні госпітальні штами клебсієл в біоплівковій культурі і в диск-

дифузійному тесті із додаванням азитроміцину до агару коли поліміксін В (споріднений колістину) було використано у формі дисків (рис. 19).

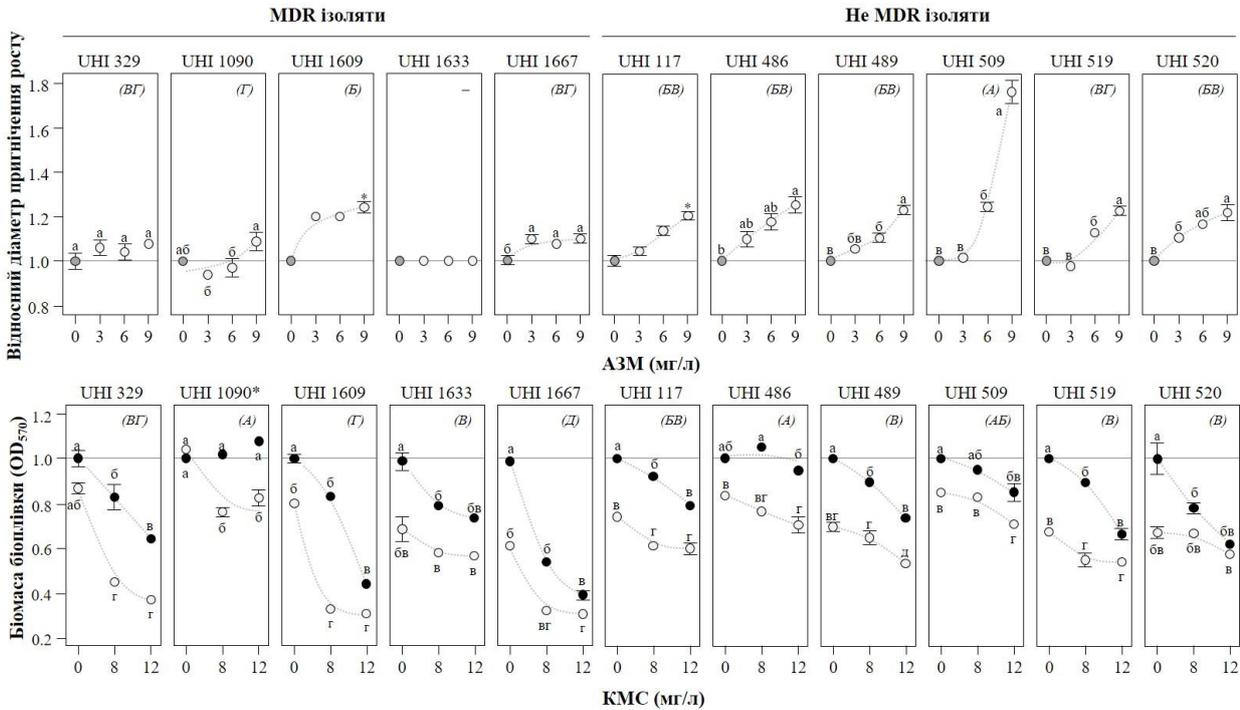


Рис. 19. Взаємодії азитроміцину (АЗМ) і колістину (КМС) в агаризованих колоніях (зверху) і біоплівках (знизу) відповідних українських госпітальних штамів *K. pneumoniae* полічутливих (не MDR ізоляти) та полірезистентних (MDR ізоляти). Контроль (без АЗМ) - темні кола, з додаванням 9 мг/л АЗМ – світлі кола. Середні значення, не з'єднані однаковими літерами в межах панелей, суттєво відрізняються (LSMeans Differences Tukey HSD, альфа = 0,05).

Значне підвищення чутливості до колістину чи поліміксину В спостерігалось зі збільшенням рівня азитроміцину для більшості штамів. Цікаво, але не всі штами показали кореляцію у впливі азитроміцину і колістину в агаризованих колоніях і біоплівках, що ще раз підкреслює принципово різні фізіологічні стани субпопуляцій бактерій, отриманих в формі біоплівки та у формі агаризованих колоній, попри спорідненість цих природньої і штучної агрегацій.

Таким чином було встановлено, що не дивлячись на задекларовану вроджену фенотипову стійкість клебсієл до макролідів всі штами *K. pneumoniae* проявляли чутливість до азитроміцину як у формі планктону, так і у формі біоплівки. Також з'ясувалось, що колістин не проявляє жодної антибактеріальної дії по відношенню до планктонної субпопуляції клебсієл, але проявляє обмежену антибіоплівкову дію. При чому, ця дія посилювалась у присутності азитроміцину, тобто антибіотики проявляли синергізм.

Для того, щоб відтворити рановий процес і дослідити взаємодії азитроміцину і колістину за умов, наближених до умов *in vivo*, було розроблено модель ранової поверхні із застосуванням колагенового матриксу, заселеного епітелізованими еукаріотичними клітинами НЕК293 та зануреної в комплексне середовище, що відтворює рановий ексудат. Три модифікації моделі було послідовно використано для відтворення інфекційного процесу, викликаного госпітальним ізолятом *K. pneumoniae* УНІ 1090, біоплівки якого раніше продемонстрували високу резистентність до комбінації азитроміцину з колістином. Для перевірки гіпотези щодо антибіоплівкового ефекту азитроміцину та посилення антибактеріального ефекту «слабкого» антибіотику колістину у формі колістин метансульфонату було проведено «лікування» *in vitro* моделі із урахуванням фармакокінетичних та фармакодинамічних параметрів обох антибіотиків. Для цього використано середні фізіологічні концентрації антибіотиків, що визначаються у сироватці пацієнта протягом стандартного режиму терапії. Зокрема, для азитроміцину було використано 10 мг/л, а для колістину – 5 мг/л. Слід також зазначити, що попри високу стійкість біоплівки *K. pneumoniae* УНІ 1090 до колістину цей штам є колістин-чутливим із МІК < 2 мг/л колістину (у формі сульфату колістину). Для відтворення моделі в розроблену систему із колагенового матриксу, в якому протягом 3-5 днів інкубувались нормальні еукаріотичні клітини лінії НЕК 293, вносили 10^4 /мл клітин нічної культури *K. pneumoniae* УНІ 1090 (рис. 20).

У відтвореній моделі рани *in vitro* азитроміцин значно пригнічував утворення біоплівки та зменшив КУО з 10^7 – 10^8 КУО/мл до 10^2 КУО/мл, що підтвердило значне покращення антибактеріальної ефективності азитроміцину і комбінації колістину з азитроміцином проти штаму клебсієли у фізіологічно відповідному середовищі. Таким чином для цих двох антибіотиків можна очікувати більший синергійний бактеріцидний ефект в умовах *in vivo*, ніж в умовах агаризованих колоній чи біоплівок *in vitro*.

Дійсно, високу ефективність азитроміцину *in vivo* було продемонстровано в клінічному випадку лікування 32-річного військовослужбовця, який отримав проникаюче поранення живота після бою на Донбасі весною 2023 року. Первинну медичну допомогу надала передова хірургічна група підкріплення у Дружківці; після стабілізації стану пацієнта того ж дня було переведено до Дніпровської обласної клінічної лікарні І. І. Мечниковим, де пацієнт перебував наступні 8 днів для стабілізації стану, протягом яких пацієнт отримав множинну полірезистентну інфекцію рани живота, вентиляційну пневмонію, сепсис.

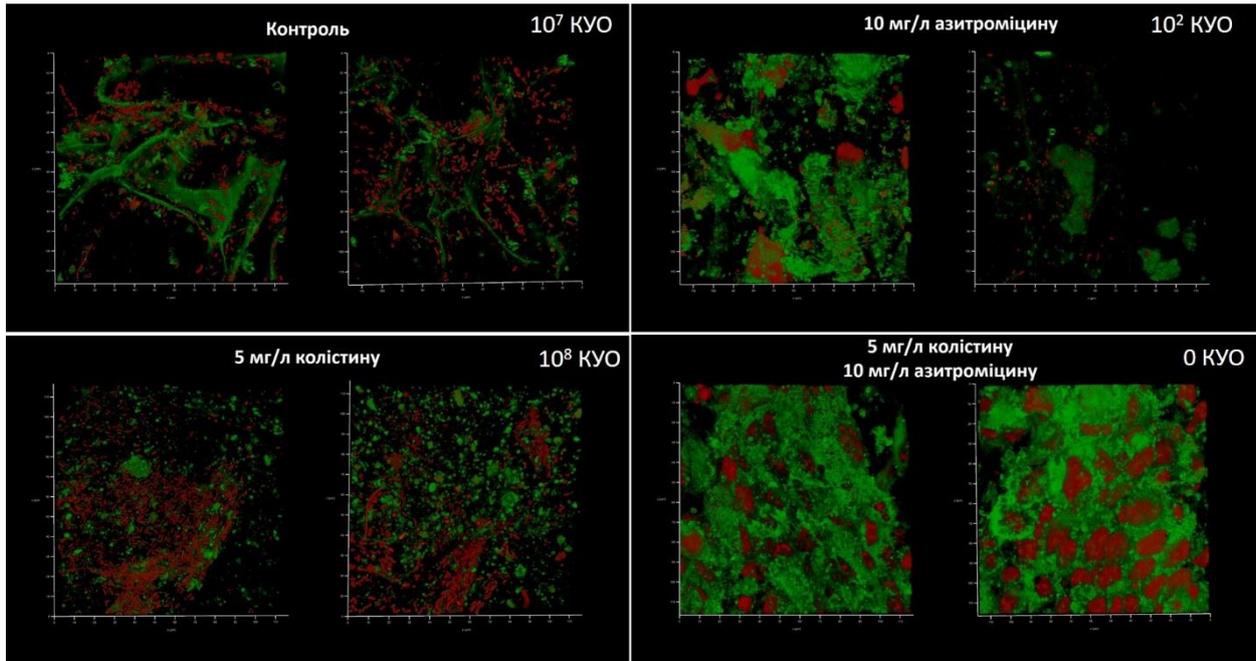


Рис. 20. Модель рани *in vitro*, колонізованої *K. pneumoniae* UHI 1090, на фоні колістину, азитроміцину або разом. Зображення були отримані після 48 годин розвитку біоплівки на 3D-колагеновому каркасі, засіяному епітеліально-подібною клітинною лінією HEK293 в присутності 5 мг/л колістину та/або 10 мг/мл азитроміцину, або без (контроль). AmyGreen використовували для забарвлення колагену (зелений сигнал), а EtBr для забарвлення еукаріотичних ядер та бактерій (червоний сигнал). Також зображено кількість колоній утворюючих одиниць (КУО) в рідині моделі.

При подальшій госпіталізації пацієнта в київську міську клінічну лікарню №6 (КМКЛ №6) стан пацієнта був критичним. Він перебував під медикаментозною седацією та мав ознаки гострого септичного шоку. Мікробіологічні аналізи мокротиння, зразків ран, сечі та катетерів крові регулярно проводилися для моніторингу інфекції пацієнта. У зразках рани, отриманих від пацієнта, було виявлено *E. coli* з множиною антибактеріальною резистентністю (MDR) та *K. pneumoniae*. Крім того, з рани також були виділені штами *E. coli*, *K. pneumoniae* та *A. baumannii* з широкою антибактеріальною резистентністю (XDR). Примітно, що був виявлений штам *P. aeruginosa* з панрезистентністю (PDR), що вказує на стійкість до всіх наявних в лікувальній практиці антимікробних засобів. Терапія тайгецикліном із колістином протягом тижня не покращувала стан пацієнта та вимагала двох гемотрансфузій, які відбулися на другий і восьмий день терапії. Значне збільшення лейкоцитів відбулося через три дні з моменту виявлення PDR *P. aeruginosa* та початку терапії азитроміцином (рис. 21). Значне динамічне зниження лейкоцитів та прокальцитоніну (PCT) розпочалося на 10-й день, коли до колістину і тигецикліну було додано азитроміцин у дозуванні 1,5 грами на добу, хоча всі виявлені ізоляти були стійкими до цього антибіотика. Цікаво, що ізолят PDR *P. aeruginosa*, отриманий на восьмий день лікування було заміщено не-MDR *P. aeruginosa* штамом, який було отримано на 22 день лікування, або на 12 день лікування азитроміцином. Цей новий штам фенотипово був чутливим до п'яти

антибіотиків, які були неефективними проти попереднього ізоляту *P. aeruginosa*. Поступова відміна тейгецикліну і колістину та введення меропенему у дозі 6 грамів на добу в терапію на 17-й день суттєво покращило стан пацієнта, призвело до нормалізації показників крові і біохімічних показників та нормалізації прокальцитоніну-маркеру сепсису (рис. 21-22) та загоєння абдомінальної рани (рис. 23).

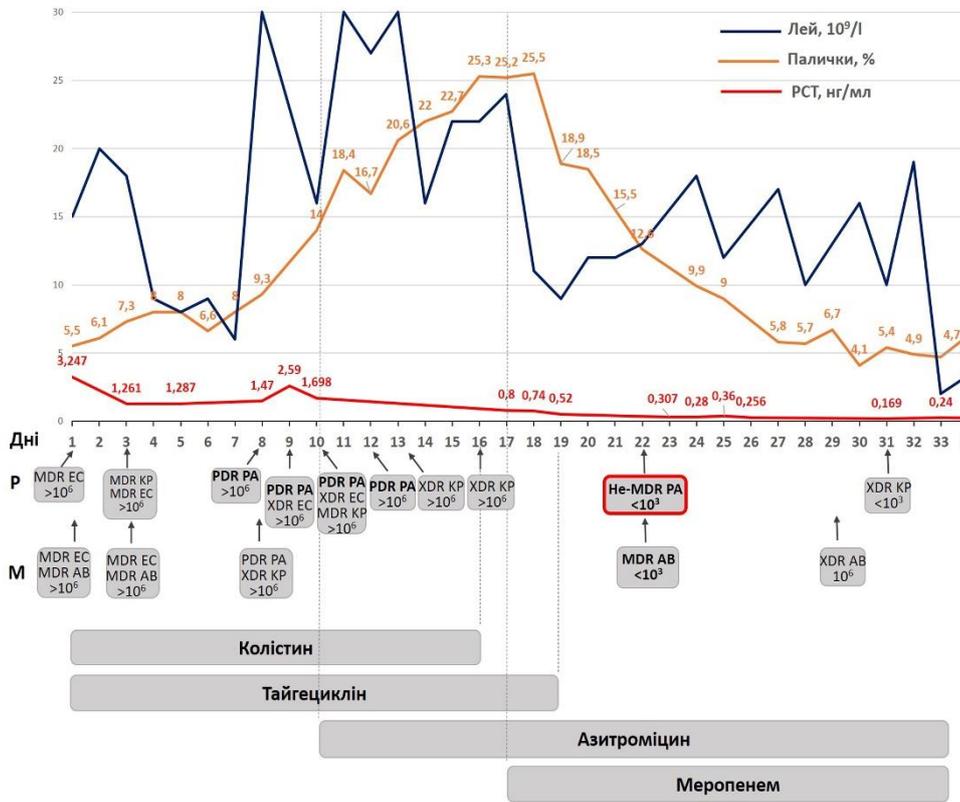


Рис. 21. Динамічна кореляція деяких маркерів запалення, лейкоцитів та гранулоцитів (паличок) під час лікування пацієнта в КМКЛ №6. Лей - Лейкоцити, РСТ - прокальцитонін; Р - рана; ЕС - *E. coli*; АВ - *A. baumannii*; КР - *K. pneumoniae*; РА - *P. aeruginosa*; MDR - мультирезистентні, XDR - майже повністю резистентні, PDR - повністю резистентні.

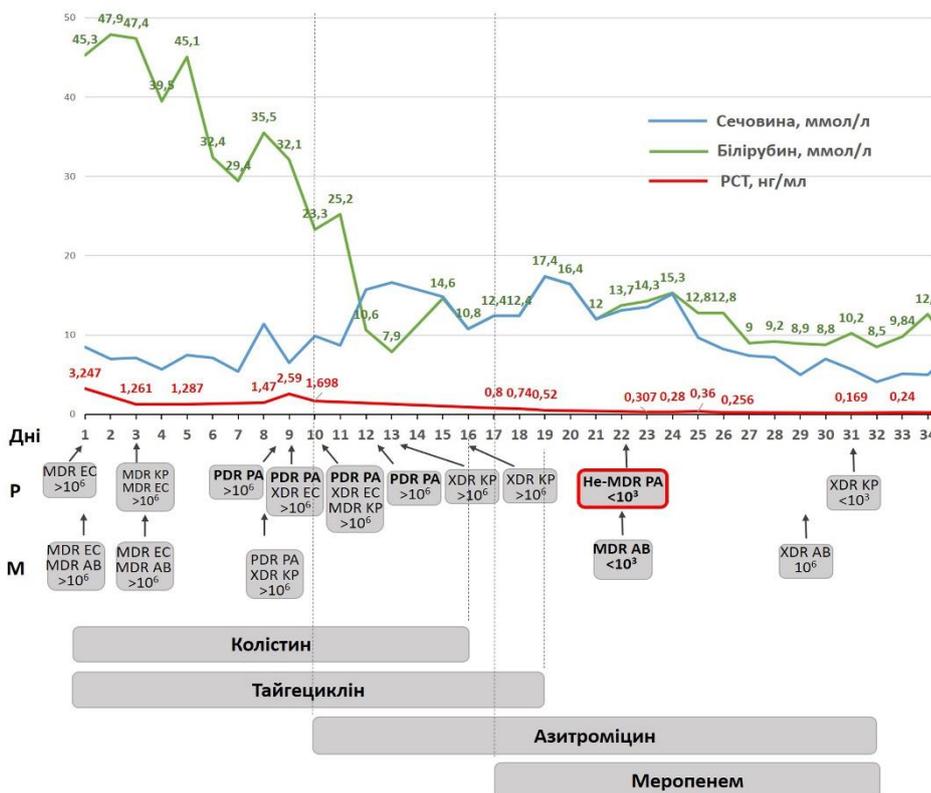


Рис. 22. Динамічна кореляція деяких біохімічних маркерів під час лікування пацієнта в КМКЛ №6. РСТ - прокальцитонін; Р - рана; М - мокротиння; ЕС - *E. coli*; АВ - *A. baumannii*; КР - *K. pneumoniae*; РА - *P. aeruginosa*; MDR - мультирезистентні, XDR - майже повністю резистентні, PDR - повністю резистентні.

Окремо треба звернути увагу на високу токсичність первинної терапії «відчаю» тайгецикліном з колістином, яка корелювала із високим рівнем білірубіну і азоту крові, які нормалізувались при відміні цих антибіотиків і на фоні терапії азитроміцином і меропенемом, що вказує на безпеку цих антибіотиків у заданих дозуваннях.

Важливо відмітити, що фенотипова резистентність до колістину і тигецикліну розвинулась після утворення біоплівки під час інфекційного процесу незважаючи на підтверджену генетичну чутливість до одного антибіотика та очікувану чутливість до іншого. Успішне використання комбінації азитроміцину та меропенему демонструє низьковитратний підхід до боротьби з XDR/PDR при множинних грамнегативних інфекціях військових ран в Україні.

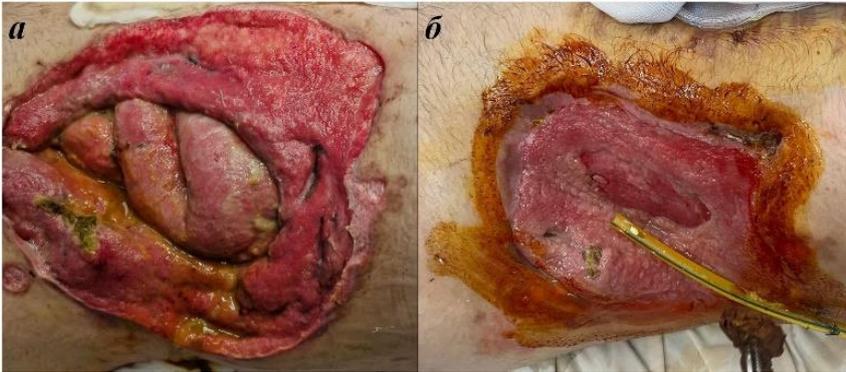


Рис. 23. Рана на 9 день госпіталізації (а) і на 36 день (б).

Взагалі, треба зазначити, що військові конфлікти завжди супроводжуються ростом ранових і

опікових інфекцій. Важкі опіки є основним компонентом травм, пов'язаних з конфліктом, і можуть призвести до високого рівня смертності. Так рани, пов'язані з конфліктами та стихійними лихами, створюють унікальні проблеми в логістичних, діагностичних та лікувальних аспектах, тоді як ширші конфлікти пов'язані зі зростанням місцевої резистентності до антимікробних препаратів.

Цілеспрямований огляд доступної літератури за останні 10 років щодо використання системних антимікробних антибіотиків у цій ситуації демонструє, що наявні дані щодо результатів вибору антимікробного засобу для ранньої профілактики інфікованих опіків обмежені. Хоча міжнародні рекомендації, як правило, не рекомендують рутинне використання профілактичних системних антибіотиків, проблеми конфліктних ситуацій та потенціал політравми, ймовірно, матимуть постійний вплив на прийняття рішень щодо антимікробних препаратів та їх використання. Необхідно докласти зусиль для розробки відповідної доказової бази в цій унікальній ситуації. Тим часом можливий прагматичний підхід до балансування селективного тиску використання антимікробних препаратів з реалістичним доступом.

Неспецифічна біоплівко-стимулююча активність фармакологічних молекул. Зворотною стороною використання неефективних режимів терапії є стимуляція утворення біоплівки інфекційним штамом. Ця стимуляція може бути неспецифічною. Відомо, що антибіотики в субоптимальних дозах сприяють утворенню біоплівки та розвитку стійкості до антибіотиків. Втім, можлива і специфічна стимуляція утворення біоплівки, яку важливо враховувати у розробці нових та використанні відомих терапевтичних

препаратів. Пошук нових антимікробних речовин методами біомедичної хімії і раціонального драг-дизайну є перспективним напрямом подолання кризи нестачі ефективних антибактеріальних речовин. Але специфічні інгібітори із антибактеріальними властивостями для обраних інфекційних штамів можуть мати неочікувані стимулюючі ефекти для інших патогенів. Відштовхуючись від цього уявлення було досліджено нову антистафілокову речовину. Зокрема, 2-(2-аміно-3-хлор-бензоїламіно)-бензойну кислоту (сполука №5), яка здатна інгібувати сортазу А *S. aureus* із параметрами IC₅₀ 59,7 мкМ. Антибактеріальний і антибіоплівковий аналізи також підтвердили високу специфічність сполуки проти двох стандартних штамів і трьох госпітальних ізолятів *S. aureus*. Втім, було досліджено, що ця сама речовина не впливала на рівні планктону двох грам-негативних штамів, зокрема, *P. aeruginosa* PA01 і *K. pneumoniae* ATCC 10031 (рис. 24).

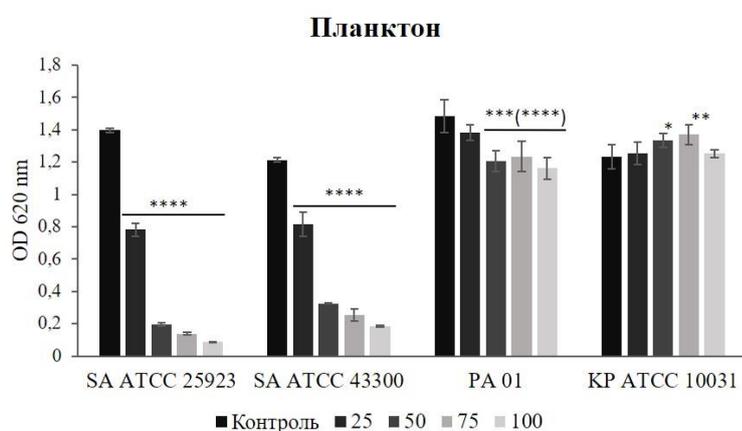


Рис. 24. Рівень планктонної біомаси *S. aureus* (SA) ATCC 25923 (MS), *S. aureus* (SA) ATCC 43300 (MR), *P. aeruginosa* (PA) PA 01, *K. pneumoniae* (KP) ATCC 10031, що утворюється у присутності сполуки №5 у концентрації 25, 50, 75, 100 мг/л (що відповідає 86 мкМ, 172 мкМ, 258 мкМ, 344 мкМ) або без неї (контроль) після 24 годин інкубації, виміряної як оптична густина при 620 нм.

Статистична значущість порівняно з контролем. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$.

Цікаво, що ця речовина не впливала на розвиток біоплівки *P. aeruginosa* PA01, але стимулювали чотирикратний ріст біомаси біоплівки *K. pneumoniae* ATCC 10031 (рис. 25).

Такий неочікуваний ефект можна пояснити відмінностями поверхневих клітинних білків клітин *K. pneumoniae* від білків стафілококу. Така відмінність може призводити до інгібування деяких регулярних або метаболічних шляхів, що пов'язані з утворенням біоплівки у *K. pneumoniae*. Зокрема, виявилось, що сортаза класу А у *K. pneumoniae* має високу гомологію до сортази у *S. aureus* з ідентичністю амінокислотної послідовності 40,5%.

Роль біоплівок як джерела генів резистентності у госпітальному середовищі.

У всьому світі зростає ризик зараження бактеріальними інфекціями, стійкими до багатьох препаратів та цілком резистентних до них, під час або після перебування в лікарні. Такі міграційні хвилі посприяли поширенню надзвичайно небезпечних MDR/XDR/PDR штамів в деяких країнах ЄС, включаючи Німеччину (Berger et al., 2023).

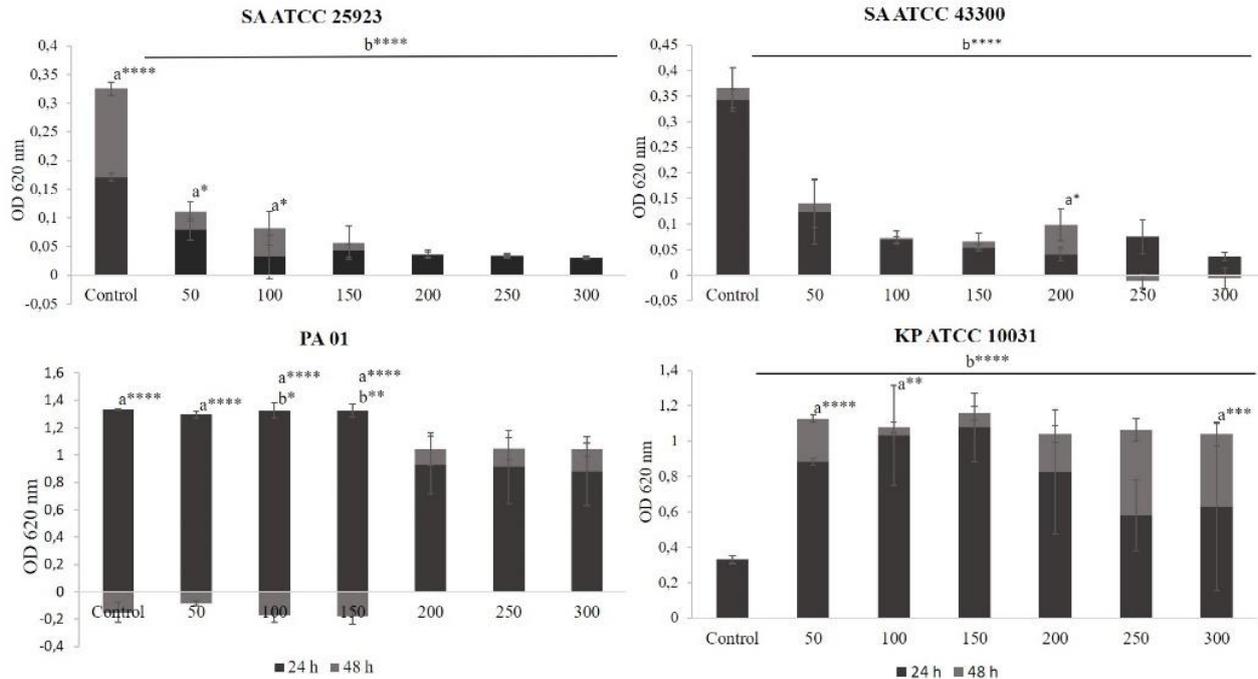


Рис. 25. Рівень загальної біомаси біоплівки *S. aureus* (SA) ATCC 25923 (MS), *S. aureus* (SA) ATCC 43300 (MR), *P. aeruginosa* (PA) PA01, *K. pneumoniae* (KP) ATCC 10031, що утворилася у присутності сполуки 5 у концентраціях 50, 100, 150, 200, 250, 300 мг/л (що відповідає 172 мкМ, 344 мкМ, 516 мкМ, 688 мкМ, 860 мкМ, 1032 мкМ) або без (контроль) після першого дня (темно-сірий, 24 год) та другого дня (світло-сірий, 48 год) інкубації, виміряний як оптична густина при 620 нм. а - статистично значуща різниця у рості на другий день порівняно з першим днем інкубації; б - статистично значуща різниця порівняно з контролем. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$.

Біологічною основою фенотипу MDR/XDR/PDR у грам-негативних бактерій є їхні гени стійкості до антибіотиків (ГАР, гени антибіотикорезистентності), або резистоми. MDR/XDR/PDR неминуче вносять свої ГАР у лікарняне середовище. Це включає ГАР, розташовані в геномах бактерій (вДНК), а також позаклітинні ГАР у екзоклітинній ДНК (еГАР). Мікробна еДНК поширена всюди, і її можна знайти скрізь, де є мікробне життя. Вона виділяється під час утворення біоплівки або через загибель клітин (Sivalingam et al., 2020). Ця еДНК зберігає динамічний пул генів за допомогою горизонтального переносу генів (ГПГ) у спільноті біоплівок. еГАР, а також вГАР (MDR/XDR/PDR бактерії) можна знайти в багатьох екологічних нішах, пов'язаних із лікарнями, наприклад, у лікарняних матеріалах (Lopez et al., 2009; Treacle et al., 2009), меблях (Lax et al., 2017) та дрібних предметах, такі як стетоскопи (Marinella et al., 1997), мобільні телефони (Brady et al., 2006; Brady et al., 2009; Ulger et al., 2009; Akinyemi et al., 2009), лікарняній каналізаційній системі (Sheppard et al., 2016).

Розповсюдженість генів антибіотикорезистентності в українській популяції грам-негативних госпітальних інфекцій. Відсутність сучасних даних з епідеміології антибіотикорезистентності в Україні підриває можливості для розуміння ситуації, що розвивається, та оптимізації

2006; Mulcahy et al., 2007; Sahu et al., 2012; Paganelli et al., 2015; Desai et al., 2019; Qian et al., 2021). Іншою важливою екологічною функцією еДНК є збереження динамічного пулу генів внаслідок ГПП всередині спільноти яка часто представляє собою єдиний простір біоплівки. еГАР є важливим джерелом природного ГПП через трансдукцію, трансформацію та кон'югаці. та переніс генів мембранними везикулами.

Вибір ефективних біоцидів, що використовуються в повсякденній лікарняній практиці, повинен враховувати роль дезінфікуючих засобів у підтримці та розвитку локального пулу ГАР, тобто резистому, та те, як вони можуть впливати на перенесення генів стійкості до антибіотиків у межах лікарняної мікробної популяції. Було досліджено здатність різних біоцидів, що рутинно використовуються в медичній практиці, впливати на вивільнення еДНК зі зрілих біоплівок двох умовно-патогенних модельних штамів *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* ATCC 25923. Вплив чотирьох груп біоцидів: спиртів, перекису водню, четвертинних амонієвих сполук та полімерного біоциду полігексаметиленгуанідину гідрохлориду (PHMG-Cl) оцінювали за допомогою матеріалу дегідрованих *P. aeruginosa* та *S. aureus* біоплівок. З'ясовано, що більшість біоцидів, за винятком PHMG-Cl та 70% етанолу, спричиняли значне вивільнення еДНК (рис. 27).

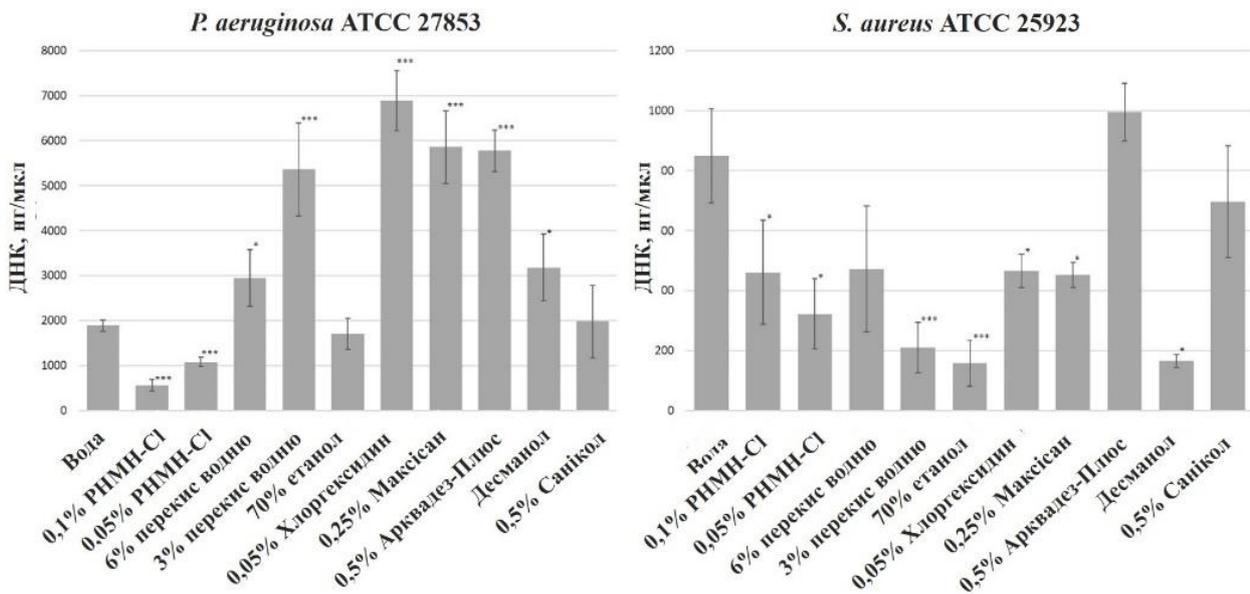


Рис. 27. Кількість еДНК, вивільнена з дегідратованих біоплівок *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* ATCC 25923 після 1 години впливу біоцидів (n = 3). Статистична значущість порівняно з впливом води (контроль) при * p < 0,05 та *** p < 0,005.

Аналіз вивільненої еДНК за допомогою гель-електрофорезу підтвердив, що PHMG-Cl знижує вихід еДНК з біоплівок *P. aeruginosa* порівняно з контрольною обробкою лише водою. На протипагу ефекту PHMG-Cl, спирти, четвертинні амонієві сполуки та 3% перекис водню суттєво сприяли вивільненню еДНК з біоплівок *P. aeruginosa*, але змогли знизити вихід еДНК з біоплівок *S. aureus*, що узгоджується з нашим прямим вимірюванням

концентрацій еДНК. Дивно, але еДНК, вивільнена з дегідратованих біоплівки після впливу біоцидів, була значною мірою неушкодженою та біологічно активною, про що свідчили результати ПЛР 16S рДНК. Однак, ПЛР-ампліфікація зразків РНMG-Cl не вдалася, що свідчить про те, що, крім зниження виходу еДНК, цей біоцид комплексувався з еДНК, запобігаючи ампліфікації цільової послідовності.

Для аналізу прямої антибіоплівкової дії РНMG-Cl *in situ*, 24-годинні біоплівки *P. aeruginosa* та *S. aureus* було оброблено різними концентраціями РНMG-Cl протягом години та виміряно загальну метаболічну активність біоплівок за допомогою МТТ (рис. 28).

Найнижча концентрація РНMG-Cl, яка суттєво не відрізнялася від біоплівки у негативному контролі, обробленої етанолом (мертвої), але значно нижча, ніж у обробленого водою (живого) позитивного контролю, вважалась біоцидною. З'ясовано, що для біоплівки *P. aeruginosa* біоцидна концентрація становила 0,1%, а для біоплівки *S. aureus* – 0,5% РНMG-Cl. Збільшення концентрації РНMG-Cl також зменшувало вихід еДНК з біоплівок. При 0,5% РНMG-Cl вихід еДНК зменшився до менш ніж чверті від результату з обробленої водою позитивної контрольної біоплівки *P. aeruginosa* і приблизно до однієї третини від результату з контрольної біоплівки *S. aureus*.

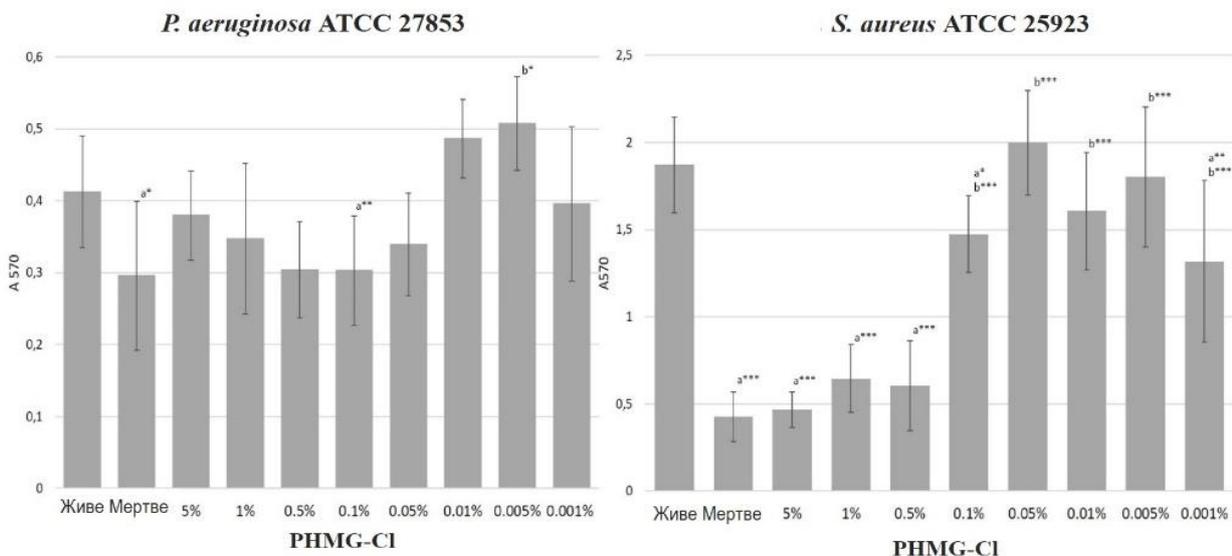


Рис. 28. Загальна метаболічна активність 24-годинних біоплівок *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* ATCC 25923 після обробки різними концентраціями РНMG-Cl протягом 1 години (n = 8). Статистичні відмінності визначені між обробками та обробленими водою (живі) позитивними контролями (a) та обробленими етанолом (мертві) негативними контролями (b); * p < 0,05, ** p < 0,01 та *** p < 0,005.

РНMG-Cl був єдиним біоцидом, який запобігав ПЛР-ампліфікації цільових послідовностей 16S рДНК зі зразків еДНК. Щоб підтвердити пряму інактивацію модельного ГАР в еДНК за допомогою РНMG-Cl, було екстраговано еДНК з біоплівок панрезистентного госпітального ізоляту *K. pneumoniae* УНІ КР 1633. Раніше було з'ясовано, що УНІ КР 1633 є паннерезистентним штамом і є стійким до карбапенемів та колістину. Для вивчення можливості ампліфікації

гена резистентності до карбапенемази КРС з еДНК, обробленої РНMG-Cl, було проведено ПЛР у реальному часі (рис. 29).

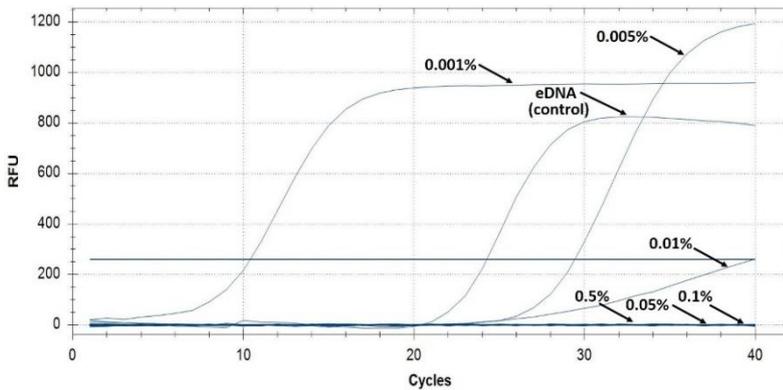


Рис. 29. Криві ампліфікації ПЛР у реальному часі гена стійкості до антибіотиків КРС із зразків еДНК УНІ КР 1633 після обробки РНMG-Cl. Контрольна еДНК оброблена водою, експериментальні зарзки оброблено 0,001–0,5% РНMG-Cl.

Відомо, що РНMG-Cl має сильні абсорбційні властивості, а повільне вивільнення з поверхонь може забезпечити тривалий антибактеріальний захист. Було проаналізовано здатність поверхонь, оброблених РНMG-Cl, зберігати ДНК-інактивуючі властивості. Окремі лунки в 96-лункові полістирольному планшеті було оброблено РНMG-Cl різної концентрації таким чином, щоб загальна експозиція в кімнатних умовах становила до 28 днів. Розчин еДНК з *P. aeruginosa* було додано до лунок, експоновано 10 хвилин та відібрано для подальшого аналізу шляхом гель-електрофорезу (рис. 30).

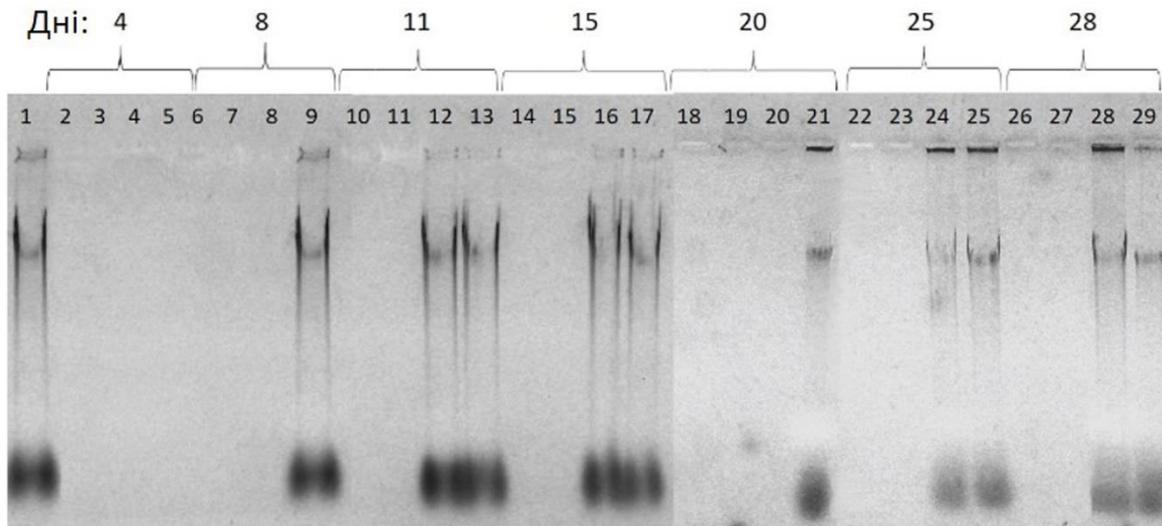


Рис. 30. Пластикова поверхня, оброблена РНMG-Cl, інактивує еДНК. 1,2% агарозний гель, забарвлений EtBr, для візуалізації еДНК, виділеної з пластику, обробленого РНMG-Cl протягом періоду до 28 днів. Обробки РНMG-Cl (1%, 0,5%, 0,1% та 0,05%) згруповані відповідно до тривалості впливу (дні). Обробки: (1) контрольна чиста поверхня, (2, 6, 10, 14, 18, 22 та 26) 1% РНMG-Cl, (3, 7, 11, 15, 19, 23 та 27) 0,5% РНMG-Cl, (4, 8, 12, 16, 20, 24 та 28) 0,1% РНMG-Cl та (5, 9, 13, 17, 21, 25 та 29) 0,05% РНMG-Cl.

Хоча загальна кількість виділеної ДНК зменшувалася з часом, після 28 днів експозиції все одно кількість ДНК залишалася достатньою, щоб продемонструвати, що поверхні, оброблені 0,5–1,0% РНMG-Cl, все ще можуть інактивувати еДНК, і що 0,05–0,1% РНMG-Cl також може захищати поверхні та інактивувати еДНК протягом 4–8 днів.

Результати демонструють, що біоциди, які зазвичай використовуються в лікарнях, можуть мати значний вплив на вивільнення еДНК з бактеріальних біоплівки. Деякі біоциди, зокрема РНMG-Cl, виявилися здатними блокувати розвиток біоплівки та утворювати комплекси з ДНК у спосіб, передбачений молекулярним докінгом. Зв'язування РНMG-Cl з ДНК змінювало електрофоретичну рухливість як високомолекулярної, так і плазмідної ДНК та запобігало ампліфікації цільового ГАР з еДНК, виділеної з біоплівки *Klebsiella*. Також було виявлено, що РНMG-Cl інактивує ДНК при використанні для обробки пластикових поверхонь, до 28 днів після нанесення. Ці результати демонструють потенціал РНMG-Cl як поверхнево-активного агента, який може бути використаний у лікарнях для зменшення поширення резистентності до антибіотиків шляхом інактивації еДНК, яка зазвичай зустрічається в бактеріальних біоплівках.

Розробка нових матеріалів із анти-біопліковою та анти-ДНК діями для вирішення проблем персистування генів стійкості до антибіотиків у госпітальному середовищі. Утворення бактеріальних біоплівки на контактних поверхнях матеріалів, що контактують з водою, є важливою і складною проблемою для багатьох середовищ як водопровідні та каналізаційні трубопроводи, гідропоніка, сантехніка, харчова упаковка, медичні пластикові вироби, медичне обладнання тощо. Відомо, що лікарняні матеріали, меблі та дрібні предмети, такі як стетоскопи, мобільні телефони та клавіатури комп'ютерів можуть бути джерелом внутрішньолікарняних інфекцій (Marinella et al., 1997; Brady et al., 2006; Akinyemi et al., 2009; Brady et al., 2009; Lopez et al., 2009; Ulger et al., 2009; Treakle et al., 2009; Lax et al., 2017). Ще однією проблемою є інфекційне ураження імплантів та розвиток імплант-асоційованої інфекції.

Ріст бактеріальних біоплівки також створює проблеми для немедичної промисловості. Часті проблемами контамінації притаманні технологічним поверхням в індустріях обробки харчових, молочних, вино-матеріалів, в системах стічних вод, що спричиняє засміченню труб, зниженню ефективності теплообміну процесів і, зрештою, псування їжі. Нарешті, мікроорбстання металевих поверхонь сприяють мікробіологічно-індукованій корозії, яка також пов'язана з біоплівками.

Отже, контроль розвитку біоплівки на поверхнях є важливою проблемою для багатьох індустрій. Поточні рішення, як правило, спираються на регулярну хімічну інактивацію поверхонь або додавання антибіотиків до матеріалів. Однак такі покриття часто навантажені гостротоксичними хімічними речовинами або хімічними речовинами з високою стійкістю та потенціалом до накопичення в екосистемах, що призводить до хронічного пошкодження відповідних екосистем та впливає на здоров'я людини. Саме тому нові підходи в модифікації таких матеріалів як, зокрема, поліамідний пластик, який використовується в медицині, алкідні покриття, що використовуються в індустрії для захисту металевих поверхонь від корозії і обрастання, чи металеві, в тому числі і біомедичні, сплави, для зниження їхньої здатності до

біообрастання може суттєво покращити екологічність матеріалів та знизити вірогідність розвитку госпітальних інфекційних ускладнень.

Вибір ефективних антимікробних добавок для поліамідних смол є дуже складним через їх високі температури обробки до 300 °С. Для цього завдання було синтезовано новий термостабільний полімерний біоцид, полігексаметиленгуанідин-2-нафталінсульфонат (PHMG-NS). Згідно з термогравіметричним аналізом, PHMG-NS має точку термічного розкладу 357 °С, що підтверджує його потенційне використання в спільній обробці розплаву з поліамідними смолами. Плівки поліаміду 11 (РА-11), що містять 5, 7 та 10 мас.% PHMG-NS, були отримані методом компресійного формування.

Антибіоплівкові/протиобростаючі властивості РА-11, модифікованого полімерним біоцидом PHMG-NS, були оцінені з використанням двох модельних штамів, що утворюють умовно-патогенні біоплівки: грамнегативної *E. coli* K12 та грампозитивного *S. aureus* ATCC 25923. З'ясовано, що обидва штами були здатні формувати твердо-рідинні біоплівки на плівках РА-11 протягом трьох днів культивування (рис. 30). Рівень біомаси біоплівки, прикріпленої до плівки РА-11, що містить 5%, 7% або 10% PHMG-NS, значно відрізнявся від рівня на контрольних плівках РА-11 у дослідженні загальної біомаси (рис. 31 а). Зокрема, утворення біоплівки зменшилося приблизно втричі для зразків, що містять 7% та 10% PHMG-NS. Але, вищий рівень забарвлення кристалічним фіолетовим, тобто вимір загальної біомаси, не завжди корелює з вищою метаболічною активністю біоплівки. Щоб оцінити, загальну метаболічну активність сформованих біоплівок паралельно було проведено МТТ-тест (рис. 31 б).

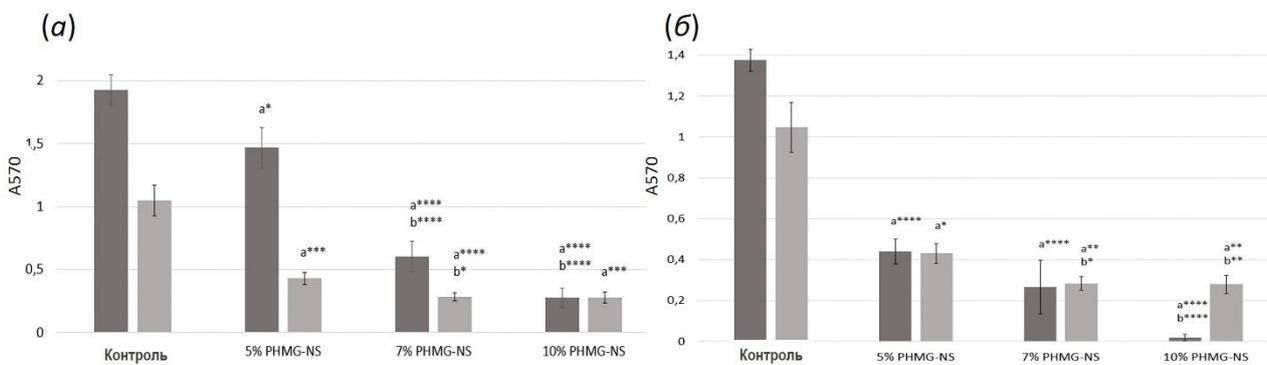


Рис. 31. Рівні біоплівок *E. coli* K12 (темно-сірий) та *S. aureus* ATCC 25923 (світло-сірий), що сформувалися на плівках РА-11, що містили 5%, 7% та 10% PHMG-NS або без (контроль) після 72 годин інкубації, визначалися як рівень біомаси фарбуванням кристалічним фіолетовим (а) або як загальна метаболічна активність за допомогою МТТ (б). а: статистична значущість порівняно з контролем; б: статистична значущість порівняно з 5% PHMG-NS. * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$.

Усі плівки РА-11, що містять PHMG-NS, показали значне зниження метаболічної активності біоплівки. Рівень метаболічної активності біоплівки був у 2,5 рази нижчим на РА-11/PHMG-NS (5%), ніж на контрольних плівках РА-11. Спостерігалася значна різниця між ростом у контрольних умовах та ростом на РА-11, що містить 5%, 7% та 10% полімерного біоциду. Не було

виявлено значної різниці між зразками, що містять 5% та 7% PHMG-NS, а також між PA-11/PHMG-NS (7%) та PA-11/PHMG-NS (10%). Загалом, спостерігалось п'ятикратне зниження метаболічної активності біоплівки для полімерних плівок, що містять 7% PHMG-NS, порівняно з контрольними плівками PA-11 для обох бактеріальних штамів ($p < 0,001$ для *E. coli* та $p < 0,01$ для *S. aureus*), і майже не спостерігалось метаболічної активності на плівках з 10% PHMG-NS, інокульованих *E. coli*.

Відомо, що позаклітинна ДНК (еДНК) відіграє досить важливу роль в ініціації та розвитку біоплівок багатьох бактерій, серед яких ті, що утворюються *E. coli* та *S. aureus*. еДНК – це негативно заряджена молекула, яка може взаємодіяти з позитивно зарядженим PA-11, що містить PHMG-NS. Щоб перевірити цю гіпотезу, загальний вміст еДНК у культурі осаджували з біоплівок на межі твердої та рідкої фази, що утворилися через 72 години в мікрокосмі (рис. 32). Спостерігалось значне зниження вмісту еДНК у біоплівках, що утворилися за наявності PA-11/PHMG-NS (7%) та PA-11/PHMG-NS (10%) для *E. coli* K12 ($p < 0,001$) та за наявності тільки PA-11/PHMG-NS (10%) для *S. aureus* ATCC 25923 ($p < 0,05$ порівняно з контрольною культурою та $p < 0,001$ порівняно з обробкою 5% PHMG-NS), кожного разу порівняно з кількістю еДНК, виявленою в мікрокосмах, що піддавалися впливу контрольних PA-11 та PA-11/PHMG-NS (5%), тоді як таких відмінностей у шарі над біоплівкою в жодному з мікрокосмів не було.

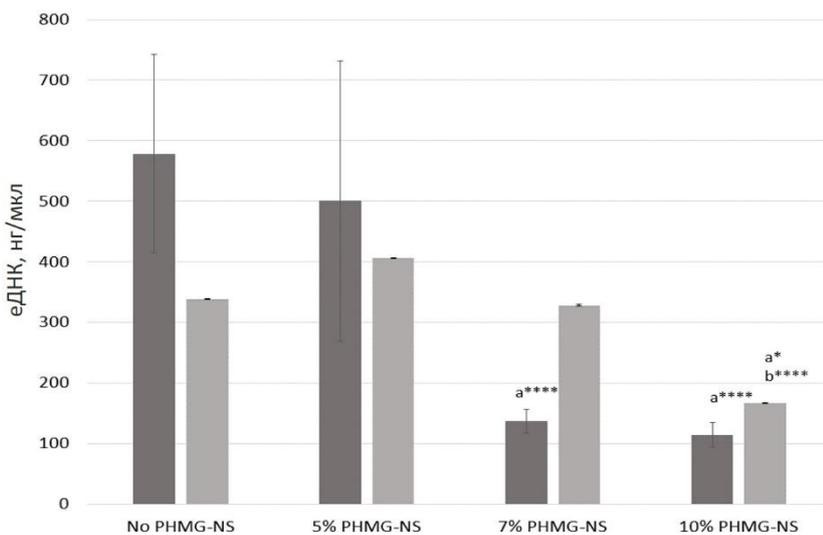


Рис. 32. Кількість еДНК, осадженої з шару біоплівки (фаза твердої фази) 72-годинних культур *E. coli* K12 (темно-сірий) та *S. aureus* ATCC 25923 (світло-сірий) зі сформованою біоплівкою з плівками PA-11, що містять 5%, 7% та 10% PHMG-NS. а, статистична значущість порівняно з контролем (без PHMG-NS); б: статистична значущість порівняно з 5% PHMG-NS. * $p < 0,05$ **** $p < 0,001$.

Таке зменшення кількості еДНК у біоплівках на межі твердої та рідкої фаз свідчить про те, що принаймні один з механізмів антибіоплівкової дії PA-11, що містить PHMG-NS, пов'язаний зі зменшенням кількості еДНК, що, у свою чергу, може впливати на початкові стадії формування бактеріальної біоплівки. Більше того, зниження рівня еДНК гіпотетично зменшить кількість генів резистентності, що поширюються горизонтально в середовищі.

Інший новий водонезмішуваний катіонний біоцид 1-додecilпіридинію додecilбензолсульфонат (PyrC 12-DBS) був синтезований та випробуваний як потенційний антиобростаючий агент для комерційної алкідної фарби PP-115

(Україна). Модифіковане покриття PP-115/PyrC 12 -DBS, що містить 16% (мас./мас.) PyrC 12-DBS, продемонструвало суттєву антибіоплівкову ефективність по відношенню до *S. aureus* ATCC 25923 та *P. aeruginosa* PA01 (рис. 33).

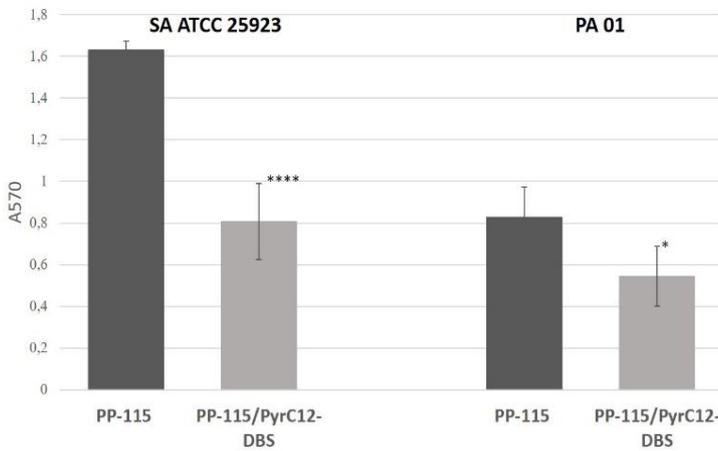


Рис. 33. Рівень метаболічної активності біоплівок *S. aureus* ATCC 25923 (ліворуч) та *P. aeruginosa* PA 01 (праворуч), що утворилися на субстраті PP-115 (контроль) та покритому PP-115/PyrC 12 -DBS (16%) після 48 годин інкубації, визначений за допомогою МТТ тесту. Статистична значущість порівняно з контролем, * $p < 0,05$, **** $p < 0,001$.

Зниження метаболічної активності біоплівки корелювало зі зменшенням біомаси клітин, що спостерігалось мікроскопічно (рис. 34). Цікаво, що PyrC 12-DBS (16%) впливав на структуру біоплівки, знижуючи вміст полісахаридів в обох біоплівках.

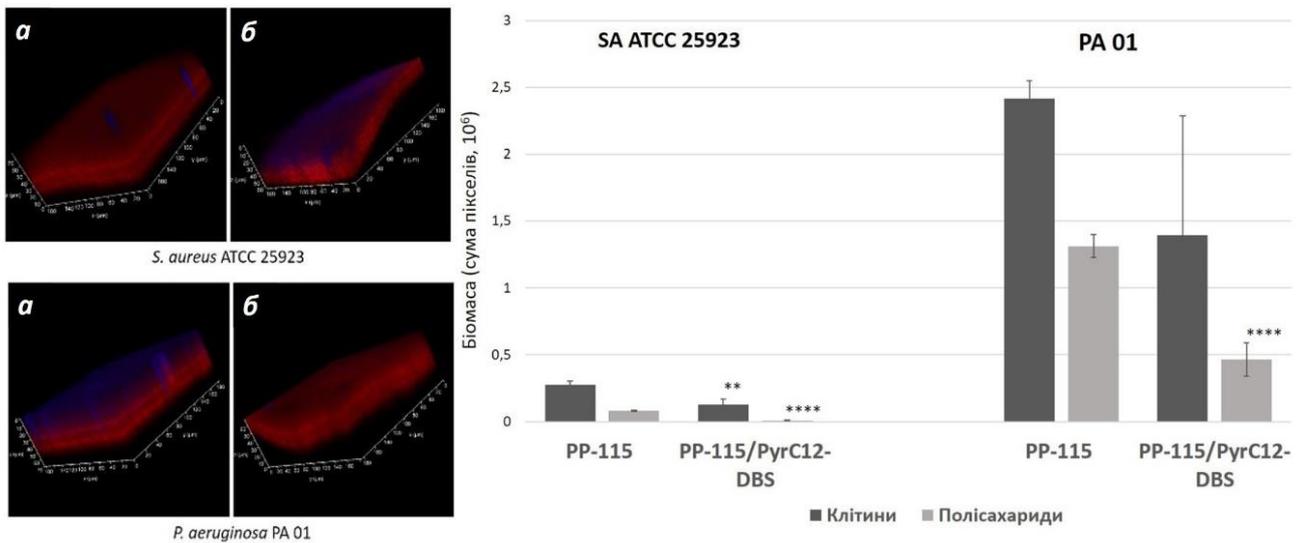


Рис. 34. CLSM-візуалізація біоплівок *S. aureus* ATCC 25923 та *P. aeruginosa* PA 01, сформованих на субстраті, покритому PP-115 (а) та PP-115/PyrC 12 -DBS (16%) (б) після 48 годин інкубації, забарвлення клітин EtBr (червоний сигнал), вуглеводів біоплівки - SW (синій сигнал) (ліворуч). Загальний рівень біомаси клітин (вДНК) і полісахаридів, виміряних як сума пікселів в 3D CLSM-зображеннях біоплівок, забарвлених EtBr та SW, сформованих на PP-115 (контроль) та PP-115/PyrC12-DBS (16%), після 48 годин інкубації (праворуч). Статистична значущість порівняно з контролем, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$.

Загалом, отримані дані свідчать про те, що контактено-активні захисні покриття на основі водонерозчинної полімерної матриці та водонерозчинного катіонного біоциду можуть ефективно протистояти біообростанню при відносно високому вмісті біоциду.

Формування біоплівки, або мікрообрастання, є основною стратегією бактерій щодо колонізації поверхні і може відбуватися на поверхнях будь-якої природи, коли присутні бактерії, в тому числі і металевої. Вплив на матрикс біоплівки може бути перспективною стратегією запобігання утворенню біоплівки. В цій роботі фемтосекундне лазерне опромінення було використано для модифікації поверхні нержавіючої сталі з метою введення текстур у вигляді конічних шипів або конічних канавок. Отримана топографія складається з ієрархічних наномікроструктур, які суттєво збільшують шорсткість (рис. 35).

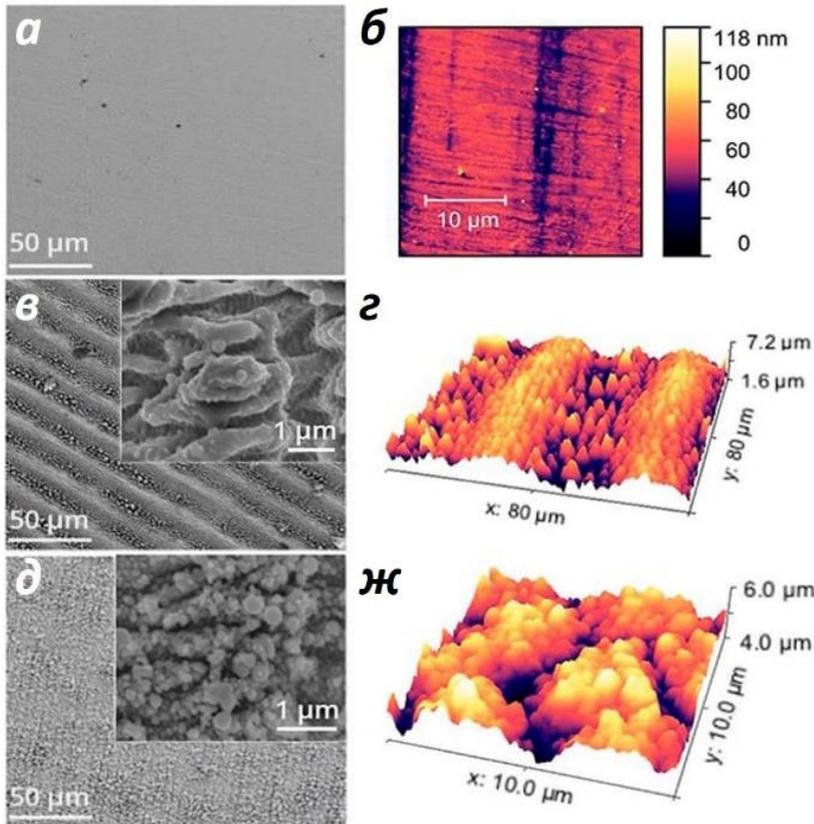


Рис. 35. СЕМ (а, в, д) та АСМ-зображення (б, г, ж) зразків з нержавіючої сталі: (а, б) необроблені, (в, г) анізотропні канавки (AG) та (д, ж) конічні шипи (CS) на оброблених лазером поверхнях. Вставки в (в, д) показують відповідні зображення з більшим збільшенням.

Біоплівки двох модельних штамів бактерій, *P. aeruginosa* PA01 та *S. aureus* ATCC29423, утворені на таких нанотекстурованих металевих поверхнях, були значно модифіковані через суттєве зниження

утворення амілоїдів та через зміни в адгезії поверхні еДНК, що призвело до значного зменшення біомаси біоплівки (рис. 36). Спостерігались мікроскопічні морфологічні зміни, які відповідали статистично значущому пригніченню біоплівок та амілоїдної біомаси, пов'язаної з модифікованими лазером поверхнями, порівняно з біоплівками на контрольних поверхнях. Утворення амілоїду у *P. aeruginosa* PA01 було пригнічено в біоплівках, сформованих на обох лазерно-модифікованих поверхнях, але відносне утворення амілоїду було іншим: воно було пригнічено у випадку AG-поверхонь, ал посилено в біоплівках, вирощених на CS. В аналізі розвитку біоплівки, вміст еДНК та амілоїду заслуговує на особливу увагу через їхню високу важливість у початковій адгезії бактерій до інертних поверхонь та в подальшому розвитку позаклітинного матриксу біоплівки. Цікаво, що у всіх варіантах товщина біоплівки залишалася постійною, тоді як позаклітинний матрикс біоплівки значно зменшився у біоплівках, сформованих на лазерно-модифікованих поверхнях, порівняно з необробленими.

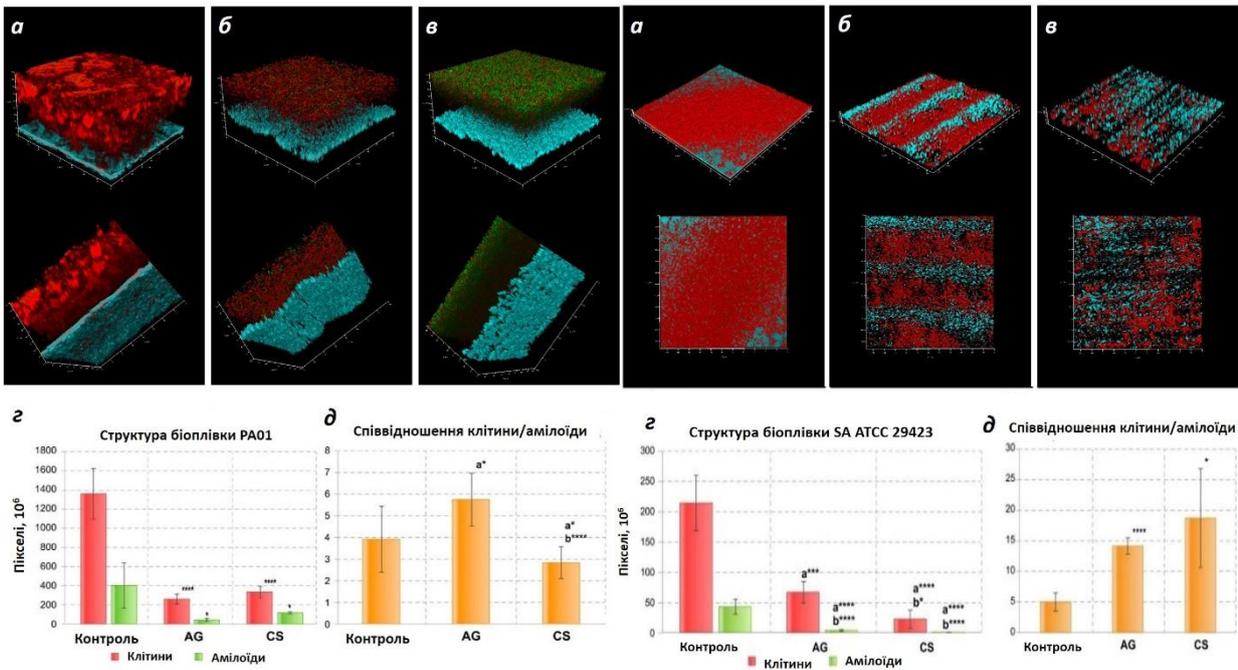


Рис. 36. CLSM зображення триденних біоплівки *P. aeruginosa* PA01 (ліворуч) і *S. aureus* ATCC29423 (праворуч), сформованих на (а) необроблених, (б) AG та (в) CS металевих поверхнях, (г) їх структура та (д) співвідношення біомаси клітин/амілоїду. У (г та д) вісь у показує кількість пікселів у сигналі або біомаси клітин (червоний колір), або амілоїдних волокон (зелений колір), розраховану після аналізу 3D CLSM-зображень біоплівки; а* вказує на статистичну значущість порівняно з контролем; b*** вказує на статистичну значущість CS порівняно з AG з * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Фарбування проводили EtBr для візуалізації клітин та eDNA (червоний сигнал) та AmyGreen (зелений сигнал) для візуалізації амілоїдів, синій сигнал - це відбите збуджувальне світло від металеві поверхні.

Ці результати демонструють, що обидві модифікації поверхні зменшують загальну біомасу біоплівки і продукцію в біоплівках обох бактерій, але мали різний вплив на тонку структуру біоплівки *P. aeruginosa* PA01 і *S. aureus* ATCC29423. Зокрема, поверхня AG відносно зменшувала вироблення амілоїду, тоді як поверхня CS посилювала його і біоплівках *P. aeruginosa* PA01. Поверхня CS також була здатна пригнічувати адгезію поверхні eDNA, що може пояснити, чому стимулювалося вироблення амілоїду: поверхня зі значною гідрофобністю може сприяти виробництву амілоїду, оскільки амілоїди є високогідрофобними адгезинами, і, як альтернатива, зменшувати адгезію ДНК, яка є повністю гідрофільною. Цікавим було те, що біоплівки *S. aureus* ATCC29423 мають тенденцію рости всередині канавок топографії AG.

Таким чином, зміна топографії металеві поверхні може радикально змінити розвиток біоплівки через зміни її архітектури. Отримані результати важливі для розробки антибактеріальних поверхонь для численних застосувань.

Біотехнології на основі біоплівки грамнегативних бактерій для вирішення завдань у агропромисловості. Пшениця є одним із найважливіших продуктів харчування та експортних товарів в Україні, при чому приблизно 95% врожаю припадає на посіви озимої пшениці (Brecker-Reshef et al., 2010). Озима

пшениця становить приблизно 95%, решта 5% — яра пшениця (Kogan et al., 2013). Але через високу вразливість культури пшениці, через кліматичні зміни і політико-економічну нестабільність, існує потреба в розробці нових більш продуктивних та технологічних підходів у покращенні та захисті пшениці (Tadesse et al., 2016).

Відомо, що кілька модельних рослин реагують на молекули бактеріального ПК (почуття кворуму) зміною росту коренів та експресією генів, а також індукованою стійкістю до рослинних патогенів. Ці сполуки можуть представляти нові біологічно активні речовини, які можна застосовувати як праймери для насіння, щоб посилити стійкість зернових культур до патогенів та абіотичного стресу, а також покращити врожайність.

В роботі біло досліджено можливість використання бактеріальної сигнальної молекули N-гексаноїл-L-гомосеринлактону (С6-HSL) класу ацилгомосеринлактонів на проростання насіння озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.), розвиток рослин та продуктивність, використовуючи два українські сорти, Володарка та Ятрань 60, як в експериментах *in vitro*, так і в польових випробуваннях.

Експерименти з пророщування *in vitro* показали, що праймування насіння пшениці розчином С6-HSL (100 нг/мл) мало невеликий, але значний позитивний вплив на рівень проростання (збільшення в 1,2 рази, $p < 0,0001$), розвиток колеоптиля (захисної оболонки, що покриває пагін, що розвивається) та корінців (зародкового кореня) дводенних проростків озимої пшениці (збільшення в 1,4 рази, $p < 0,0001$).

Польові випробування протягом двох вегетаційних періодів (2015–2016 та 2016–2017) також продемонстрували значне покращення біомаси на стадії кущення (збільшення в 1,4 рази, $p < 0,0001$), а також структури врожаю та продуктивності в період дозрівання, включаючи врожайність зерна (збільшення в 1,4–1,5 рази, $p < 0,0007$) та якість (збільшення якості зерна в 1,3 рази, $p < 0,0001$) (табл.1). У деяких випадках спостерігався вплив сорту ($p < 0,05$), що свідчить про те, що ефект праймінгу С6-HSL може залежати від генетики рослин, а деякі переваги праймінгу також були очевидні у рослин F1, вирощених з насіння, зібраного попереднього сезону ($p = 0,05$). Аналіз зібраних даних продемонстрував значний вплив року ($p < 0,05$), що можна пояснити холоднішими умовами та меншою кількістю сезонних опадів у другий вегетаційний період. Праймування мало значний вплив на загальну висоту рослин, кількість пагонів, довжину качана, кількість колосків на качан, кількість зерен на качан та масу зерна на рослину у 2015–2016 та 2016–2017 роках ($p < 0,0001$), а також спостерігався значний вплив сорту пшениці ($p < 0,0001$), причому Ятрань 60 загалом перевершив сорт Володарка (дані за 2015–2016 та 2016–2017 роки наведено в табл. 1).

Таблиця 1.

Структура продуктивності (2015–2016 та 2016–2017).

Сезон	Сорт		Контроль	Пелетовані (П)	П/Контроль	Праймовані і пелетовані (Пр)	Пр/Контроль
2015-2016	Володарка	Висота рослини (см)	93.1 ± 0.3	91.6 ± 0.6	0.98	94.3 ± 0.3	1.01
		Кількість пагонів на рослину	6.6 ± 0.1	7.1 ± 0.1	1.08	11.8 ± 0.2	1.79
		Довжина колоса (см)	12.2 ± 0.2	11.9 ± 0.2	0.98	13.6 ± 0.1	1.12
		Кількість колосків на колос	17.2 ± 0.2	18.4 ± 0.1	1.07	19.3 ± 0.1	1.12
		Кількість зерен на колосок	41.0 ± 0.5	42.5 ± 0.5	1.04	52.5 ± 0.6	1.28
		Маса зерна на рослину (г)	1.57 ± 0.02	1.68 ± 0.02	1.07	2.18 ± 0.03	1.39
	Ятрань 60	Висота рослини (см)	84.7 ± 0.4	83.3 ± 0.3	0.98	86.7 ± 0.3	1.02
		Кількість пагонів на рослину	7.3 ± 0.2	7.3 ± 0.1	1.00	12.7 ± 0.2	1.74
		Довжина колоса (см)	13.4 ± 0.1	13.4 ± 0.1	1.00	13.5 ± 0.1	1.01
		Кількість колосків на колос	21.0 ± 0.1	20.9 ± 0.1	1.00	21.6 ± 0.1	1.03
		Кількість зерен на колосок	44.0 ± 0.4	45.7 ± 0.3	1.04	55.8 ± 0.3	1.27
		Маса зерна на рослину (г)	1.57 ± 0.03	1.68 ± 0.03	1.07	1.98 ± 0.02	1.26
2016-2017	Володарка	Висота рослини (см)	85.2 ± 0.4	82.2 ± 0.3	0.97	83.4 ± 0.4	0.98
		Кількість пагонів на рослину	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.1	0.88	4.5 ± 0.2	1.88
		Довжина колоса (см)	12.3 ± 0.2	12.2 ± 0.2	0.99	13.1 ± 0.2	1.07
		Кількість колосків на колос	17.3 ± 0.3	18.1 ± 0.1	1.05	18.8 ± 0.3	1.09
		Кількість зерен на колосок	38.1 ± 0.4	36.4 ± 0.6	0.96	40.2 ± 0.7	1.06
		Маса зерна на рослину (г)	1.64 ± 0.07	1.68 ± 0.05	1.02	2.20 ± 0.08	1.34
	Ятрань 60	Висота рослини (см)	78.3 ± 0.3	79.4 ± 0.2	1.01	80.8 ± 0.3	1.02
		Кількість пагонів на рослину	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	0.91	4.8 ± 0.2	2.18
		Довжина колоса (см)	12.8 ± 0.2	13.0 ± 0.2	1.02	13.9 ± 0.2	1.09
		Кількість колосків на колос	16.3 ± 0.2	15.2 ± 0.4	0.93	20.1 ± 0.4	1.23
		Кількість зерен на колосок	39.6 ± 0.4	38.2 ± 0.6	0.97	46.5 ± 0.9	1.17
		Маса зерна на рослину (г)	1.47 ± 0.04	1.52 ± 0.05	1.03	1.84 ± 0.06	1.25

Праймування також мало значний позитивний вплив на врожайність сільськогосподарських культур (кг/м²) з масою зерна в 1,4х та 1,5х більшою, ніж у необробленому контролі ($p < 0,0007$) у 2015–2016 та 2016–2017 роках відповідно. Вплив праймування С6-HSL на врожайність також очевидний за даними РСА за роком та сортом (рис. 37).

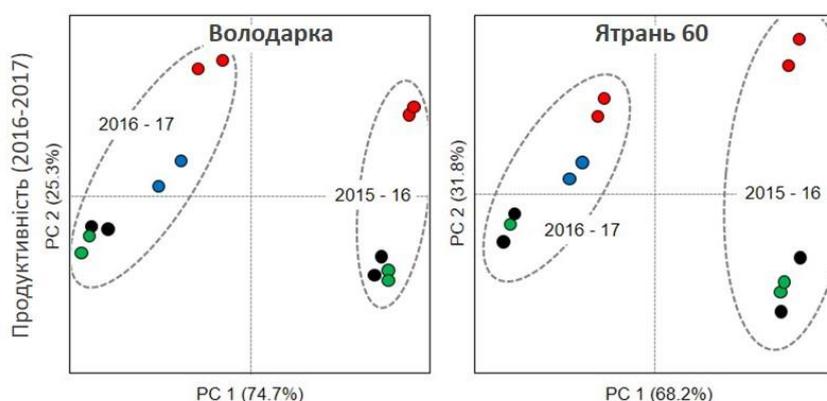


Рис. 37. Аналіз головних компонентів (РСА) продуктивності озимої пшениці (загальна надземна біомаса, біомаса соломи та маса зерна) диференціос рослини, вирощені з насіння F1, отриманого з пелетованих та праймованих рослин у

2015–2016 роках та посіяного у 2016–2017 роках (синій) від рослин, вирощених з пелетованого та праймованого (червоний), пелетованого (зелений) або необробленого (чорний) насіння. У цих аналізах також очевидний сильний вплив року для обох сортів пшениці (позначено пунктирними овалами). Масштаби осей однакові для кожної діаграми, і для обох головних осей показано кумулятивну відсоткову коваріацію.

В окремому дослідженні на сусідньому дослідному полігоні Глеваха у 2016–2017 роках було виявлено, що праймування має значний вплив на загальний рівень хлорофілу та каротиноїдів, а також на стадію розвитку рослини (від виходу в трубку, цвітіння, молочної стиглості до молочно-воскової стиглості) ($p < 0,0001$), а для каротиноїдів також спостерігався значний вплив сорту пшениці ($p = 0,006$). Ці результати свідчать про те, що позитивний ефект, який спостерігається при обробці насіння С6-HSL, триває протягом усього розвитку пшениці, аж до дозрівання рослин та виробництва зерна.

Зерно, вироблене у 2016–2017 роках, було досліджено, щоб визначити, чи впливає праймування насіння на якість зерна чи середню масу. З'ясувалось, що праймування мало значний вплив на якість зерна, причому частка хорошого зерна була в 1,3 рази більшою, ніж у необробленому контролі ($p < 0,0001$), хоча впливу сорту пшениці не спостерігалось ($p = 0,08$). Більш складний спектр факторів, включаючи якість зерна, обробку насіння та взаємодію якості насіння - обробка насіння та обробка насіння - сорт пшениці, мав значний вплив на середню масу зерна ($p < 0,0001, 0,0164, 0,0002, 0,0006$ відповідно), хоча впливу сорту пшениці не спостерігалось ($p = 0,46$). Ці результати свідчать про те, що праймування насіння також впливає на якість та масу зерна.

Зерно F1, зібране з рослин з праймованим насінням, вирощених у 2015–2016 роках, було протестовано, щоб визначити, чи передається ефект праймінгу насіння наступному поколінню пшениці. Повторний аналіз попередніх експериментів, включаючи дані F1, показав значні відмінності між рослинами, вирощеними з насіння F1, та необробленим контрольним насінням у семи з 11 параметрів (табл. 2). Це свідчить про те, що ефект праймінгу насіння передається наступному поколінню пшениці.

Таблиця 2.

Порівняльна характеристика F1.

		P	Контрольне насіння	Пелетоване насіння	Пелетоване і праймоване насіння	F1 насіння
Проростки	Розвиток колеоптиля (мм)	<0.0001	2.1±0,1		2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.1
	Розвиток корінців (мм)	<0.0001	6.9±03		9.7 ± 0.4	7.9 ± 0.3
Структура продуктивності	Висота рослини (см)	<0.0001	81.7±.4	80.8 ± 0.2	82.1 ± 0.3	80.2 ± 0.2
	Кількість пагонів на рослину	<0.0001	2.3±0.1	2.1 ± 0.1	4.6 ± 0.1	3.4 ± 0.1
	Довжина колоса (см)	<0.0001	12.6 ± 0.1	12.6 ± 0.1	13.5 ± 0.1	12.9 ± 0.1
	Кількість колосків на колос	<0.0001	16.8 ± 0.2	16.7 ± 0.3	19.4 ± 0.3	17.6 ± 0.3
	Кількість зерен на колос	<0.0001	38.8 ± 0.3	37.3 ± 0.4	43.4 ± 0.6	40.7 ± 0.4
	Маса зерна на рослину (г)	<0.0001	1.55 ± 0.04	1.60 ± 0.04	2.02 ± 0.05	1.67 ± 0.04
	Маса зерна на колос (г)	<0.0001	1.55 ± 0.04	1.60 ± 0.04	2.02 ± 0.05	1.67 ± 0.04
Структура врожаю	Загальна надземна біомаса (кг/м ²)	<0.0001	0.52 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0.73 ± 0.01
	Біомаса соломи (кг/м ²)	0.0004	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.30 ± 0.01
	Маса зерна (кг/м ²)	<0.0001	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.43 ± 0.01

Ці результати польових досліджень свідчать про те, що бактеріальні ацил-гомосерин лактони, такі як С6-HSL, можуть бути використані для покращення росту та врожайності зернових культур, а також для зменшення залежності від фунгіцидів та добрив для боротьби з патогенами та стресом.

ВИСНОВКИ

Отримані в роботі результати є суттєвим вкладом в розуміння структури і функціонування деяких грам-негативних бактерій, зокрема умовно-патогенних і патогенних штамів. Велику увагу приділено патогенетичній ролі біоплівки грам-негативних бактерій. Зокрема, досліджено феноменологію утворення біоплівок при пародонтиті та при інфекційних процесах, опосередкованих *K. pneumoniae*. Досліджено біоплівку як нову фармакологічну мішень при лікуванні інфекцій, спричинених грам-негативними бактеріями. Окремо розглядається роль біоплівки у підтримці пулу генів резистентності в екологічній ніші, можлива роль різноманітних біоцидів в підтримці такого локального резистому та розглядається можливість створення нових матеріалів із підвищеною стійкістю то біообрастання біоплівками. Також розглядається можливість створення нових агробіотехнологій праймування продуктивних рослин хімічними аналогами медіаторів бактеріального почуття кворуму.

1. Целюлоза є важливим структурним компонентом матриксу біоплівок багатьох *Proteobacteria*, зокрема, *P. fluorescens* SBW25, *P. syringae*, *B. avium*. Для всіх цих бактерій притаманна однотипність оперону продукції целюлози *bcs*. Для *P. fluorescens* SBW25 целюлоза є головним структурним полімером біоплівки в той час як у *B. avium* целюлоза присутня у невеликій кількості і не впливає на міцність біоплівки. Для *P. fluorescens* SBW25 адаптативна колонізація зони розподілу фаз (менісковий ріст) призводить до утворення і домінування мутантного штаму-суперпродуценту целюлозної біоплівки *Wrinkly Spreader*. На молекулярному рівні випадкові мутації шляхом відбору призводять до селекції мутантів, що накопичують вторинний клітинних месенджер *c-di-GMP*, який посилює синтез целюлози і утворює міцну біоплівку а зоні меніску. Це у свою чергу дозволяє штаму краще конкурувати та перехоплювати більше кисню.

2. Іншим важливим компонентом матриксу біоплівки грамнегативних бактерій є амілоїдні фібрили. За допомогою власного нового високочутливого амілоїд-специфічного барвника *AmyGreen* було візуалізовано амілоїдні компоненти екзоклітинного матриксу в біоплівках *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* SBW25, *B. avium* і *S. aureus*.

3. eДНК – ще один важливий компонент матриксу різноманітних моно і полімікробних біоплівок. Продемонстровано, що eДНК може мати значення в утворенні біоплівкового матриксу *P. fluorescens* SBW25 WS особливо на первинних стадіях утворення біоплівки

4. Почуття кворуму є прикладом гормональної надклітинної регуляції, внаслідок якої мікробна популяція регулює роботу геномів та координує свої фізіологічні процеси, зокрема, і утворення біоплівок.

5. Біоплівки чинників інфекційних процесів завжди є активними учасниками патогенезу. Взаємодія імунної системи хазяїна із парадонтопатогенною флорою при пародонтиті призводить до посилення біоплівок, зокрема, продемонстровано, що eДНК хазяїна, джерелом якої є

імунокомпетентні клітини, вбудовується в біоплівки парадонтопатогенів та становить приблизно 70% від загальної еДНК біоплівки. Таким чином, еДНК активованих імунокомпетентних клітин господаря може бути основним фактором персистенції бактерій і розвитку патологічного запалення при пародонтиті.

6. Розуміння патогенетичної ролі біоплівок інфекційних ізолятів відкриває нові фармакологічні можливості для створення альтернативних терапевтичних протоколів, заснованих на антибіоплівковій терапії. Продемонстровано, що азитроміцин пригнічує утворення біоплівок *K. pneumoniae*. Комбінація азитроміцину із таргетним антибіотиком підвищує ефективність останнього, що продемонстровано при лікуванні пацієнта із множинною генералізованою інфекцією, викликаною асоціацією повністю резистентних грам-негативних бактерій. Отримані результати підкреслюють необхідність пошуку нових ефективних протимікробних терапевтичних підходів як альтернативні стратегії лікування інфекцій із високою резистентністю.

7. Зворотною стороною використання неефективних режимів терапії є стимуляція утворення біоплівки інфекційним штамом. Показано, що специфічні інгібітори із антибактеріальними властивостями, зокрема, експериментальна протистафілококова сполука №5 стимулювала розвиток біоплівки *K. pneumoniae* ATCC 10031.

8. Досліджено роль біоплівок як джерела генів резистому у госпітальному середовищі при оброці біоплівок різноманітними біоцидами, що використовуються у практиці. З'ясовано, що всі біоциди, окрім РНMG-С1, сприяли вивільненню еДНК.

9. Нові сконструйовані матеріали, зокрема, поліамід 11 із додаванням РНMG-NS, фарба РР-115 із додаванням РурС 12-DBS і мікроструктуровані лазером металеві поверхні продемонстрували значні анти-біоплівкові та для деяких матеріалів – ДНК-інактивуючі дії для вирішенні проблем персистування генів стійкості до антибіотиків у госпітальному середовищі.

10. Бактеріальні гормони сприймаються сенсорними системами макроорганізмів, зокрема, рослинами, як стресорні сигнали, що призводить до активації імунної відповіді, що може бути використано для створення нових екологічних агробіотехнологій, як це демонструється на прикладі двох українських сортів озимої пшениці, які суттєво підвищили свою врожайність в наслідок праймування бактеріальної сигнальною молекулою С6-HSL.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Pallett S.J.C., Morkowska A., Woolley S.D., Potochilova V.V., Rudnieva K.L., Iungin O.S., Sgro V., Boyd S.E., Reece N., Lambert Z.L., Tan N.K., Mughal N., **Moshynets O.V.**, Moore L.S.P., O'Shea M.K. Evolving antimicrobial resistance of extensively drug-resistant Gram-negative severe infections associated with conflict wounds in Ukraine: an observational study. *Lancet Regional Health - Europe*. 2025

Mar 20;52:101274. [https://doi: 10.1016/j.lanpe.2025.101274](https://doi.org/10.1016/j.lanpe.2025.101274) [IF 13,6; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2024 Public Health, Environmental and Occupational Health] (Особистий внесок здобувача: збір колекції ізолятів, обговорення результатів, написання рукопису).

2. Pallett S.J.C., Morkowska A., Woolley S.D., O'Shea M.K., Moore L.S.P., **Moshynets O.** Severe conflict-associated wound infections complicated by the discovery of carbapenemase-coproducing *Pseudomonas aeruginosa* in Ukraine. *Lancet Microbe*. 2024 Dec 6:101046. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.101046> [IF 20,9; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2023 Infectious diseases, Microbiology (medical)] (Особистий внесок здобувача: збір колекції ізолятів, обговорення результатів, написання рукопису).

3. Pallett S.J., Mistry R., Lambert Z.L., Woolley S.D., Abbara A., Breathnach A.O., Lamb L.E., Williams A., Mughal N., **Moshynets O.**, Hughes S.J., O'Shea M.K., Moore L.S. (2024) Conflict and catastrophe-related severe burn injuries: A challenging setting for antimicrobial decision-making. *Journal of Infection* 89 (3): 106224. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106224> [IF 14,3; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2023 Infectious diseases] (Особистий внесок здобувача: аналіз національних підходів у веденні опікових пацієнтів в Україні).

4. Slobodianyuk-Kolomoiets M., Khlebas S., Mazur I., Rudnieva K., Potochilova V., Iungin O., Kamyshnyi O., Kamyshna I., Potters G., Spiers A.J., **Moshynets O.** (2024) Extracellular host DNA contributes to pathogenic biofilm formation during periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 14: 1374817. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1374817> [IF 4,6; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2023 Infectious diseases] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування та адміністрування роботи, аналіз літератури, проведення лабораторних досліджень, аналіз результатів, написання рукопису).

5. Rogalsky S., **Moshynets O.**, Dzhuzha O., Tarasyuk O., Hubina A., Darabut A.M., Lobko Y., Morozovska I., Protasov O., Bardeau J.F. (2024) Preparation and characterization of new antifouling coating based on alkyd paint modified with hydrophobic cationic biocide. *Journal of Coatings Technology and Research* 21: 939-953. <https://doi.org/10.1007/s11998-023-00862-8> [IF 2,3; SCOPUS; SCImago Q2 – 2023 Surfaces, coatings and films] (Особистий внесок здобувача: проведення антибіоплівкових досліджень, аналіз результатів, написання рукопису).

6. Gnilitskyi I., Rymar S., Iungin O., Vyshnevskyy O., Parisseg P., Potters G., Zayats A.V., **Moshynets O.** (2023) Femtosecond laser modified metal surfaces alter biofilm architecture and reduce bacterial biofilm formation. *Nanoscale Advance* 5(23): 6659–6669. <https://doi.org/10.1039/D3NA00599B> [IF 4,6; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2023 Materials Science] (Особистий внесок здобувача: проведення антибіоплівкових досліджень, проведення мікроелементного аналізу, скануюча електронна мікроскопія зразків, аналіз результатів, написання рукопису).

7. Kryzhevskiy V., Strokous V., Lifshyts Y., Rybianets Y., Oberniak A., Krikunov A., Iungin O., Potochilova V., Rudnieva K., Petakh P., Kamyshnyi A., **Moshynets O.** (2023) Case report: Azithromycin-meropenem combination therapy

- as a low-cost approach to combat PDR gram-negative infections of war wounds in Ukraine. *Frontiers in Medicine*, 10:1264492. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1264492> [IF 3,1; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2023 Medicine] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз літератури, ведення пацієнта, аналіз результатів, графічне представлення динаміки показників, написання рукопису).
8. **Moshynets O.V.**, Baranovskyi T.P., Iungin O.S., Krikunov A.A., Potochilova V.V., Rudnieva K.L., Potters G., Pokholenko I. (2023) Therapeutic potential of an azithromycin-colistin combination against XDR *K. pneumoniae* in a 3D collagen-based in vitro wound model of a biofilm infection. *Antibiotics* 12: 293. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020293> [IF 4,3; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2023 Pharmacology] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз літератури, планування та адміністрування роботи, дослідження біоплівки в умовах моделі ранової інфекції, порівняльний аналіз антибіоплівкової дії антибіотиків, аналіз результатів, написання рукопису).
9. **Moshynets O.V.**, Baranovskyi T.P., Cameron S., Iungin O.S., Pokholenko I., Jerdan R., Kamyshnyi A., Krikunov A.A., Potochilova V.V., Rudnieva K.L., Spiers A.J. (2022) Azithromycin possesses biofilm-inhibitory activity and potentiates non-bactericidal colistin methanesulfonate (CMS) and polymyxin B against *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS ONE* 17(7): e0270983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270983> [IF 3,7; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2022 Multidisciplinary] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз літератури, планування та адміністрування роботи, дослідження біоплівки, порівняльний аналіз антибіоплівкової дії антибіотиків, порівняльний аналіз синергійної дії антибіотиків за методом Кірбі-Бауера, аналіз результатів, написання рукопису).
10. **Moshynets O.V.**, Pokholenko I., Iungin O., Potters G., Spiers A.J. (2022) eDNA, Amyloid fibers and membrane vesicles identified in *Pseudomonas fluorescens* SBW25 biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 15096. <https://doi.org/10.3390/ijms232315096> [IF 4,9; SCOPUS, WoS; SCImago Q2 – 2022 Molecular biology] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування та адміністрування роботи, проведення комбінованого дослідження біоплівки, мікроскопічні дослідження біоплівки, виділення мембранних везикул, проведення трансмісійної електронної мікроскопії зразків везикул, спектрофотометричні дослідження, виділення і аналіз білків матриксу біоплівки і білків мембранних везикул, аналіз отриманих результатів, написання рукопису).
11. **Moshynets O.V.**, Baranovskyi T.P., Iungin O.S., Kysil N.P., Metelytsia L.O., Pokholenko I., Potochilova V.V., Potters G., Rudnieva K.L., Rymar S.Y., Semenyuta I.V., Spiers A.J., Tarasyuk O.P., Rogalsky S.P. (2022) eDNA inactivation and biofilm inhibition by the polymeric biocide polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG-Cl). *International Journal of Molecular Sciences* 23(2):731. <https://doi.org/10.3390/ijms23020731> [IF 4,9; SCOPUS, WoS; SCImago Q2 – 2022 Molecular biology] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз

літератури, планування та адміністрування роботи, отримання моделей біоплівки, підбір біоцидів для порівняльних досліджень, виділення ДНК, спектрофотометричний аналіз, аналіз якості ДНК, аналіз пролонгованості дії полімерного біоциду ПГМГ-ГХ, аналіз результатів, написання рукопису).

12. Volynets G.P., Barthels F., Hammerschmidt S.J., **Moshynets O.V.**, Lukashov S.S., Starosyla S.A., Vyshniakova H.V., Iungin O.S., Bdzhola V.G., Prykhod'ko A.O., Syniugin A.R., Sapelkin V.M., Yarmoluk S.M., Schirmeister T. (2022) Identification of novel small-molecular inhibitors of *Staphylococcus aureus* sortase A using hybrid virtual screening. *Journal of Antibiotics* 75: 321–332. <https://doi.org/10.1038/s41429-022-00524-8> [IF 2,1; SCOPUS; SCImago Q2 – 2022 Drug discovery] (Особистий внесок здобувача: проведення досліджень на біоплівках, аналіз результатів, написання рукопису).

13. **Moshynets O.**, Chernii S., Chernii V., Losytskyu M.Y., Karakhim S., Czerwieńiec R., Pekhnyo V., Yarmoluk S., Kovalska V. (2020) Fluorescent β -ketoenole AmyGreen dye for visualization of amyloid components of bacterial biofilms. *Methods and Applications in Fluorescence* 8(3). DOI 10.1088/2050-6120/ab90e0 [IF 2,3; SCOPUS; SCImago Q1 – 2020 Instrumentation] (Особистий внесок здобувача: проведення мікроскопічних досліджень на біоплівках, аналіз результатів, написання рукопису).

14. **Moshynets O.**, Bardeau J.F., Tarasyuk O., Makhno S., Cherniavska T., Dzhuzha O., Potters G., Rogalsky S. (2019) Antibiofilm activity of polyamide 11 modified with thermally stable polymeric biocide polyhexamethylene guanidine 2-naphthalenesulfonate. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 348. <https://doi.org/10.3390/ijms20020348> [IF 4,9; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2019 Organic chemistry] (Особистий внесок здобувача: проведення антибіоплівкових досліджень, аналіз результатів, написання рукопису).

15. **Moshynets O.**, Babenko L., Rogalsky S., Iungin O., Foster J., Kosakivska I., Potters G., Spiers A. (2019) Priming winter wheat seeds with the bacterial quorum sensing signal N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) shows potential to improve plant growth and seed yield. *PLoS ONE*, 14 (2): e0209460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209460> [IF 3,7; SCOPUS, WoS; SCImago Q1 – 2022 Multidisciplinary] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування та адміністрування роботи, проведення мікробіологічних досліджень, курація польових і лабораторних досліджень, обрахунок результатів, аналіз результатів, написання рукопису).

16. **Moshynets O.V.**, Foster D., Karakhim S.A., McLaughlin K., Rogalsky S.P., Rymar S.Y., Volynets G.P., Spiers A.J. (2018) Examining c-di-GMP and possible QS regulation in *Pseudomonas fluorescens* SBW25: links between intra and inter-cellular regulation benefits community cooperative activities such as biofilm formation. *Ukrainian Biochemical Journal* 90(3): 17-31. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj90.03.017> [SCOPUS; SCImago Q4 – 2018 Biochemistry] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, аналіз літератури, біоінформатичний аналіз, написання рукопису).

17. McLaughlin K., Folorunso A.O., Deeni Y.Y., Foster D., Gorbatiuk O., Hapca S.M., Immoor C., Koza A., Mohammed I.U., **Moshynets O.**, Rogalsky S., Zawadzki K., Spiers A.J. (2017) Biofilm formation and cellulose expression by *Bordetella avium* 197N, the causative agent of bordetellosis in birds and an opportunistic respiratory pathogen in humans. *Research in Microbiology* 168: 419-430. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.01.002> [IF 2,5; SCOPUS, WoS; SCImago Q3 – 2019 Microbiology] (Особистий внесок здобувача: дослідження структури біоплівки штамів *B. avium*, аналіз отриманих результатів, написання рукопису).
18. Koza A., Kusmierska A., McLaughlin K., **Moshynets O.**, Spiers A.J. (2017) Adaptive radiation of *P. fluorescens* SBW25 in experimental microcosms provides an understanding of the evolutionary ecology and molecular biology of A-L interface biofilm-formation. *FEMS Microbiology Letters* 364 (12). [IF 2,2; SCOPUS, WoS; SCImago Q3 – 2017 Microbiology] (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, написання рукопису).
19. **Moshynets O.V.**, Spiers A.J. (2016) Viewing biofilms within the larger context of bacterial aggregations. In “Biofilms”, p. 3-22, InTech Press. DOI: 10.5772/62912. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, концептуалізація, написання рукопису та підготовка глави монографії до друку).
20. **Moshynets O.**, Boretska M., Spiers A.J. (2013) From Winogradsky’s column to contemporary research using bacterial microcosms. In Harris C.C. (eds.) “Microcosms: Ecology, Biological Implications and Environmental Impact”; p. 1-27, April, Nova Publisher. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, концептуалізація, підготовка і проведення досліджень, підготовка ілюстративного матеріалу, написання рукопису та підготовка глави монографії до друку).
21. Spiers A.J., Deeni Y., Folorunso A.O., Koza A., **Moshynets O.**, Zawadzki K. (2013) Cellulose expression in *Pseudomonas fluorescens* SBW25 and other environmental pseudomonads. In: van de Ven T. & Godbout L. (eds.) “Cellulose – Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications”, p. 1-26, InTech Press, 2013. – 304 p. DOI: 10.5772/53736 (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, написання рукопису та підготовка глави монографії до друку).

Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Moshynets O.**, Slobodanyk-Kolomoiets M., Khlebas S., Mazur I., Rudnieva K., Potochilova V., Iungin O., Potters G., Spiers A. J. Extracellular host DNA contributes to pathogenic biofilm formation during periodontitis. Eurobiofilms 2024, oral presentation O-14, Copenhagen, Denmark, 24-29 June 2024. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив усну доповідь).
2. **Moshynets O.**, Gnilitskyi I., Rymar S., Iungin O., Vyshnevskyy O., Potters G. Laser modification of metal surfaces alters biofilm architecture and reduce bacterial biofilm formation. Eurobiofilms 2024, poster presentation PG2-62, Copenhagen, Denmark, 24-29 June 2024. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь)

засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

3. **Moshynets O.**, Iungin O., Rymar S., Gnilitzkyi I., Potters G. Nano-structured metal surfaces demonstrated alteration in biofilm architecture and reduction in biofilm formation. The 9th Thesinge biofilm meeting on biomaterial-associated infections May 13-14, 2024, Thesinge, The Netherlands. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

4. **Moshynets O.**, Iungin O., Potochilova V., Rudnieva K. Azithromycin mitigates PDR phenotype and improves sensitivity to meropenem in PDR *Klebsiella pneumoniae* biofilms. 34th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases ESCMID-Global, Abstract/ePoster Number: 4227/P0182, 27 – 30 April 2024, Barcelona, Spain. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

5. **Moshynets O.**, Kryzhevskiy V., Strokous V., Lifshyts Y., Rybianets Y., Oberniak A., Iungin O., Potochilova V., Rudnieva K. The alternative low-cost approach to combating PDR gram-negative infections of war injuries in Ukraine using a combination of azithromycin-meropenem. 34th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases ESCMID-Global, Abstract/ePoster Number: 06182/P4128, 27 – 30 April 2024, Barcelona, Spain. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

6. **Moshynets O.**, Baranovskyi T., Iungin O., Pokholenko I., Potochilova V., Krikunov A., Spiers A., Rudnieva K. Adaptation to azithromycin mitigates PDR phenotype and restores sensitivity to meropenem in PDR *Klebsiella pneumoniae*. 33rd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Abstract/ePoster Number: 3094/P0461, 15 – 18 April 2023, Copenhagen, Denmark. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

7. **Moshynets O.**, Rudnieva K., Potochilova V., Iungin O., Baranovskyi T., Spiers A., Krikunov A., Pokholenko I. Biomimetic wound surface model using collagen-based 3D scaffolds seeded with HEK293 cells show azithromycin-colistin combination treatment highly effective against XDR *K. pneumoniae* infection. 33rd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Abstract/ePoster Number: 2720/P1021, 15 – 18 April 2023, Copenhagen, Denmark. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах

отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

8. **Moshynets O.** Azithromycin in a combined application of antibacterials against PDR *K. pneumoniae*: does it influence antibiotic bioavailability and permeability?“, “Molecular basis of antibiotic permeability in Gram-negative bacteria” Workshop, 21-24 June 2022, Hamburg, Germany. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив усну доповідь).

9. **Moshynets O.**, Rudnieva K., Baranovskyi T., Potochilova V., Iungin O., Pokholenk I., Spiers A.J. Azithromycin reveals biofilm–inhibitory activity and potentiates non-bactericidal colistin methanesulfonate against *Klebsiella pneumonia*. Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against the Russian invaders, p. 61, 15-17 June 2022, Kyiv, Ukraine. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив усну доповідь).

10. Pokholenko I., Rudnieva K., Baranovskyi T., Potochilova V., Iungin O., Spiers A., Krikunov A. A., **Moshynets O.** Biomimetic 3D model to reproduce wound-associated biofilm-related infectious process *in vitro*. Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against the Russian invaders, p. 53, 15-17 June 2022, Kyiv, Ukraine. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив усну доповідь).

11. **Moshynets O.V.**, Baranovskyi T.P., Iungin O.S., Kysil N.P., Metelytsia L.O., Pokholenko I., Potochilova V.V., Potters G., Rudnieva K.L., Rymar S.Y., Semenyuta I.V., Spiers A.J., Tarasyuk O.P., Rogalsky S.P. Biocides contribute to antibiotic resistance spread by increase eDNA release from biofilms. – 00365. The 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, No 365, 23 - 26 April 2022, Lisbon, Portugal. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив усну доповідь).

12. **Moshynets O.**, Krykunov O., Iungin O., Jerdan R., Filonenko G., Spiers A. Azithromycin possesses biofilm-inhibitory activity against *Klebsiella pneumonia* and potentiates colistin to combat *klebsiella*-associated infection. - 051-DKMP. 6 th Joint Conference of DGHM & VAAM, 8-11 March 2020, Leipzig, Germany. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

13. **Moshynets O.**, Chernii S., Snihirova Y., Czerwieniec R., Chernii V., Yarmoluk S., Kovalska V. AmyGreen is a new amyloid-sensitive stain for biofilm research - 101-MCBP. 6 th Joint Conference of DGHM & VAAM, 8-11 March 2020, Leipzig, Germany. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).
14. **Moshynets O.**, Iungin O., De Baere K., Meskens R., Leyn M., Bardeau J.F., Tarasyuk O., Makhno S., Cherniavska T., Dzhuzha O., Potters G., Rogalsky S. Polyhexamethylene guanidine salts as an effective biofouling and DNA inhibitor for polymeric articles and protective coatings. 8th Congress of European Microbiologists, July 7-11, 2019, Glasgow, UK. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).
15. **Moshynets O.**, Spiers A. Identification of extracellular DNA in *P.fluorescens* SBW25 air-liquid interface biofilms. 8th Congress of European Microbiologists, July 7-11, 2019, Glasgow, UK. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).
16. **Moshynets O.V.**, Vodianyk A.A., Krykunov O.A., Spiers A.J. Azithromycin-colistin as a new combination therapy against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: anti-biofilm activity and treatment effectiveness. Setting our sights on infectious diseases Conference, 12-15 May 2019, University of Dundee, UK. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив усну доповідь).
17. **Moshynets O.**, Spiers A., Krykunov A. Azithromycin-colistin as a new combination therapy against carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* sepsis: anti-biofilm activity and treatment effectiveness. – P2461. The 29th Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 13-16 April 2019, Amsterdam, the Netherlands. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).
18. **Moshynets O.**, Babenko L., Foster, J., Kosakivska I., Iungin O., Potters G., Rogalsky S., Jerdan R., Bamanga, R, Spiers A. The quorum-signal N-hexanoyl-L-homoserine lactone applied as a winter wheat seed primer has a phytostimulative effect. – 166 B. 17th Symposium of International Society on Microbial Ecology, ISME, 12-17 August 2018, Leipzig, Germany. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).
19. **Moshynets O.**, Bardeau J.F., Tarasyuk O., Makhno S., Cherniavska T., Dzhuzha O., Rogalsky S. Antibiofilm activity of polyamide 11 modified with cationic

biocide. – P2085. The 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21 - 24 April 2018, Madrid, Spain. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

20. **Moshynets O.**, Babenko L., Foster, J., Kosakivska I., Iungin O., Potters G., Rogalsky S., Jerdan R., Vamanga R, Spiers A. The quorum-sensing molecule N-hexanoyl-L-homoserine lactone applied in seed priming effects phytosphere microflora, chlorophyll levels and crop yield of winter wheat. – EMV30. Annual Conference 2018 of the Association for General and Applied Microbiology, VAAM 2018, March 17-20, Wolfsburg, Germany. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

21. **Moshynets O.**, Rogalsky S., Iungin O., Voychuk S., Tarasyuk O., Potters G. Cationic biocides as potential antifouling agents for polymeric coatings/plastic systems. Annual Conference 2018 of the Association for General and Applied Microbiology, VAAM 2018, March 17-20, Wolfsburg, Germany. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

22. **Moshynets O.**, Babenko L., Karakhim S., Kharkhota M., Kosakivska I., Rogalsky S., Shcherbatiuk M., Suslova O., Spiers A. N-acyl-L-homoserine lactones are inter-kingdom signalling molecules controlling quorum sensing in the Gram-negative bacteria and priming plants increasing stress adaptation. P.5.4-035, Abstract of the 42-nd Congress of Federation of European Biochemical Societies, Jerusalem, Israel; 10–14 September 2017. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

23. **Moshynets O.**, Rogalsky S., Irodov D., Karakhim S., Tarnavsky S., Kharhota M., Volynets G., Spiers A. *Pseudomonas fluorescens* SBW25 uses N-octanoyl-L-homoserine lactone as a quorum sensing molecule. Abstract No 691 of the 7th Congress of European Microbiologists, July 9-13, 2017, Valencia, Spain. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

24. Babenko L.M., Rogalsky S.P., Suslova O.S., Shcherbatiuk M.M., Kosakivska I.V., **Moshynets O.V.** The quorum-sensing molecule N-hexanoyl-L-homoserine lactone used for presowing wheat seed priming reveals phytostimulated activity and affects the rhizosphere microflora. Book of Abstracts of the 14th Symposium on Bacterial Ecology and Genetics, 4-8 June 2017, Aberdeen, UK. – P.102-103. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах

отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

25. **Moshynets O.V.**, Rymar S.Y., Rogalsky S.P., Kisyl N.P., Spiers A.J. Biocides as a causative agent of the emergence of pan-drug resistance: biocidal effects on DNA structure and biological activity. The 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22 - 25 April 2017, Vienna, Austria. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

26. **Moshynets O.V.**, Rogalsky S., Karakhim S.O. Spiers A.J. Evidence of quorum sensing in the biofilm-forming soil and plant-associated *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Biofilms 7, 26-28 June 2016, Porto, Portugal – P1: 62. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

27. Protasov A., Bardwau J.F., Morozovskaya I., Guryanova G., Metelytsia L., Kalashnikova L., Kopernyk I., Kipnis L., Tarasyuk O., **Moshynets O.**, Rogalsky S. New antifouling coating containing polymeric biocide polyhexamethylene guanidine molybdate. 18th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, 19-24 June 2016, Toulon, France – P.219. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

28. **Moshynets O.V.**, Rogalsky S.P., Babenko L.M., Shcherbatiuk M.M., Spiers A.J. Quorum sensing in Gram-negatives: from a biofilm to the plant immunity. II International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century”, 14-15 April 2016, Kiev, Ukraine. (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

29. **Moshynets O.**, Rogalsky S., Bellenberg S., Boretska M., Irodov D., Kararhim S., Spiers A. *Pseudomonas fluorescens* SBW25 uses two signaling pathways utilizing N-acylhomoserine lacton and alpha-hydroxy ketones. Proceedings of the 6th FEMS2015, 7-11 June 2015, Maastricht, The Netherlands. – FEMS-1379 (Особистий внесок здобувача: тези і доповідь засновані на результатах отриманих здобувачем або під його керівництвом, здобувач написав тези конференції та безпосередньо представив стендову доповідь).

30. **Moshynets O.**, Rogalsky S., Pokholenko J., Irodov D., Kararhim S., Spiers A.J. *Pseudomonas fluorescens* SBW25 reveals AHL-dependent quorum sensing behaviour in culture and biofilms. Proceedings of the Biofilms 6, International Conference on Microbial Biofilms, 11-13 May 2014, Vienna, Austria. – P. 46.

АНОТАЦІЯ

Мошинець О. В. Біотехнологічні і структурно-функціональні особливості і клінічні аспекти біоплівки грамнегативних бактерій. - Кваліфікаційна наукова праця на правах наукової доповіді за сукупністю статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія» (біологічні науки). – Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, 2025.

В роботі було проаналізовано структурну роль целюлози, мембранні везикули і білковий склад матриксу біоплівки *P. fluorescens* SBW25 WS, та досліджено роль целюлози в утворенні біоплівки диким ізолятом *B. avium* 197N. Окрім того, досліджено феноменологію оперонів бактеріальної целюлозосинтази (bcs, від bacterial cellulose synthase) у *Proteobacteria*.

Для дослідження важливого компоненту біоплівки грамнегативних бактерій амілоїдних фібрил було розроблено новий високочутливий зелений випромінюючий барвник AmyGreen, який було використано для візуалізації амілоїдних компонентів екзоклітинного матриксу в біоплівках *E. coli*, *P. fluorescens* SBW25 WS, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. avium* і *S. aureus*.

Було комплексно досліджено патологічні біоплівки, що утворюються при пародонтиті. Було досліджено під'ясенний цитологічний (мікро) ландшафт при пародонтиті, з'ясовано роль езоклітинної ДНК (еДНК) та запропоновано концепцію ролі імунної еДНК господаря в запаленні при пародонтиті. Встановлено, що еДНК бактерій становить менше третини загальної еДНК в цитологічному ландшафті, а переважна кількість еДНК при пародонтиті вивільняється з нейтрофільних позаклітинних пасток.

Розуміння патогенетичної ролі біоплівки інфекційних ізолятів відкриває нові фармакологічні можливості для створення альтернативних терапевтичних протоколів, заснованих на антибіоплівковій терапії. На прикладі номінально стійкої до макролідів бактерії *K. pneumoniae* ATCC 10031 було продемонстровано антибіоплівкову ефективність азитроміцину та здатність підвищувати ефективність таргетного антибіотику метансульфонату колістину при біоплівкових інфекціях, спричинених *K. pneumoniae*. Ця синергетична дія також була підтверджена на колекції госпітальних полірезистентних ізолятів *K. pneumoniae*. Ця сама терапевтична комбінація азитроміцину і метансульфонату колістину була досліджена на розробленій моделі рани *in vitro*. Азитроміцин було успішно використано у комплексній терапії пацієнта, хворого на септичний шок, спричинений множинною карбапенем-резистентною грамнегативною мікрофлорою.

Іншою стратегією протидії розвитку антимікробної резистентності є пошук нових антимікробних речовин методами біомедицинської хімії і раціонального драг-дизайну. Втім треба пам'ятати, що специфічні інгібітори із антибактеріальними властивостями для обраних інфекційних штамів можуть мати неочікувані стимулюючі ефекти для інших патогенів. Проаналізовано

нову антистафілококову речовину 2-(2-аміно-3-хлор-бензоїламіно)-бензойну кислоту, яка не впливала на розвиток біоплівки *P. aeruginosa* PA01, але стимулювала чотирикратний ріст біомаси біоплівки *K. pneumoniae* ATCC 10031.

Біоплівки є не тільки прямим патологічним фактором, а ще й опосередкованим через підтримання пулу генів антибіотикорезистентності. Саме через це вибір ефективних біоцидів, які використовуються в рутинній лікарняній практиці, повинен враховувати роль дезінфікуючих засобів у підтримці та розвитку місцевого резистому. Досліджено вплив різних біоцидів, зокрема, спиртів, перекису водню, сполук четвертинного амонію та полімерний біоцид полігексаметиленгуанідин гідрохлорид (PHMG-Cl) вивільнення еДНК із зрілих біоплівок двох опортуністичних модельних штамів *P. aeruginosa* ATCC 27853 і *S. aureus* ATCC 25923. Було виявлено, що PHMG-Cl зв'язується з високомолекулярною ДНК і плазмідною ДНК, інактивація еДНК на поверхнях продовжується навіть після 4 тижнів після обробки поверхні біоцидом. PHMG-Cl також ефективно інактивував еДНК у вигляді гену стійкості до антибіотиків, пов'язаного з біоплівкою, що було знайдено в еДНК полірезистентного штаму *K. pneumoniae*.

Утворення біоплівки, або мікрообрастання, є основною стратегією бактерій для колонізації поверхні та може відбуватися на поверхні будь-якої природи, де присутні бактерії. Вплив на структуру біоплівки може бути ефективною стратегією зниження мікрообрастання поверхонь. Досліджено декілька шляхів модифікації матеріалів, зокрема, поліамід з полігексаметиленгуанідин 2-нафталінсульфонатом, алкідна фарба PP-115 із полімерним катіонним біоцидом 1-додецилпіридиній додещилбензолсульфонат (PyrC 12-DBS) і лазер-модифікована металева поверхні, які призводили до зниження мікрообрастання бактеріями *S. aureus* ATCC 25923 і *P. aeruginosa* PA01.

Втім, феномен біоплівок може також бути використано у створення нових агробіотехнологій. Сполуки почуття кворуму можуть представляти нові активні речовини, які можна застосовувати як праймери для насіння рослин для підвищення стійкості зернових культур до хвороботворних мікроорганізмів та абіотичного стресу та підвищення врожайності. Було досліджено позитивні ефекти гексанойл гомосерин лактону (ГГЛ) на проростання насіння пшениці озимої *Triticum aestivum* L., розвиток рослин та їхню продуктивність на прикладі двох українських сортів пшениці озимої Володарка та Ятрань 60.

Ключові слова: біоплівка, грам-негативні бактерії, целюлоза, амілоїди, еДНК, почуття кворуму, інфекція, біоциди, антибіотикорезистентність, азитроміцин, праймування рослин.

SUMMARY

Moshynets O. V. Biotechnological and structural and functional features, and clinical aspects of biofilms of gram-negative bacteria. - Qualification scientific work in the form of a scientific report based on research articles.

Thesis for a degree of Doctor of Biological Sciences (D.Sc.) in Biology, speciality 03.00.20 - Biotechnology (biological sciences). - Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The structural role of cellulose, membrane vesicles and protein composition of the biofilm matrix of *P. fluorescens* SBW25 WS, the role of cellulose in the formation of biofilms by the wild isolate *B. avium* 197N as well the phenomenology of the bacterial cellulose synthase (bcs) operons in *Proteobacteria* were investigated.

To study an important component of biofilms of gram-negative bacteria, amyloid fibrils, a new highly sensitive green emitting dye AmyGreen was developed, which was used to visualize amyloid components of the extracellular matrix in biofilms of *E. coli*, *P. fluorescens* SBW25 WS, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. avium* and *S. aureus*.

Pathological biofilms formed during periodontitis were comprehensively investigated. The subgingival cytological (micro)landscape in periodontitis was investigated, the role of extracellular DNA (eDNA) was elucidated, and the concept of the role of host immune eDNA in inflammation in periodontitis was proposed. It was found that bacterial eDNA constitutes less than a third of the total eDNA in the cytological landscape, and the majority of eDNA in periodontitis is released from neutrophil extracellular traps.

Understanding the pathogenetic role of biofilms of infectious isolates opens up new pharmacological opportunities for the creation of alternative therapeutic protocols based on antibiofilm therapy. Using the nominally macrolide-resistant bacterium *K. pneumoniae* ATCC 10031, the antibiofilm efficacy of azithromycin and the ability to enhance the efficacy of the target antibiotic colistin methanesulfonate in biofilm infections caused by *K. pneumoniae* were demonstrated. This synergistic effect was also confirmed in a collection of hospital multi-resistant isolates of *K. pneumoniae*. This same therapeutic combination of azithromycin and colistin methanesulfonate was studied in an *in vitro* wound model. Azithromycin was successfully used in the complex therapy of a patient suffering from septic shock caused by multiple carbapenem-resistant Gram-negative microflora.

Another strategy to counteract the development of antimicrobial resistance is the search for new antimicrobial substances using biomedical chemistry and rational drug design methods. However, it should be remembered that specific inhibitors with antibacterial properties for selected infectious strains may have unexpected stimulating effects for other pathogens. A new antistaphylococcal substance 2-(2-amino-3-chloro-benzoylamino)-benzoic acid was analyzed, which did not affect the development of *P. aeruginosa* PA01 biofilm, but stimulated a fourfold increase in the biomass of *K. pneumoniae* ATCC 10031 biofilm.

Biofilms are not only a direct pathological factor, but also an indirect one through the maintenance of the antibiotic resistance gene pool. That is why the selection of effective biocides used in routine hospital practice should take into account the role of disinfectants in the maintenance and development of local resistance. The effects of various biocides, including alcohols, hydrogen peroxide, quaternary ammonium compounds, and the polymeric biocide polyhexamethyleneguanidine hydrochloride (PHMG-Cl), on the release of eDNA from mature biofilms of two opportunistic model strains *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 25923 were investigated. PHMG-Cl was found to bind to high-molecular-weight DNA and plasmid DNA, and eDNA inactivation on surfaces continued even after 4 weeks of surface treatment with the biocide. PHMG-Cl also effectively inactivated eDNA in the form of a biofilm-associated antibiotic resistance gene, which was found in the eDNA of a multidrug-resistant *K. pneumoniae* strain.

Biofilm formation, or microfouling, is a major strategy of bacteria for surface colonization and can occur on any surface of any nature where bacteria are present. Influencing the biofilm structure can be an effective strategy to reduce surface microfouling. Several ways of modifying materials have been investigated, in particular, polyamide with polyhexamethyleneguanidine 2-naphthalenesulfonate, alkyd paint PP-115 with the polymeric cationic biocide 1-dodecylpyridinium dodecylbenzenesulfonate (PyrC 12-DBS), and laser-modified metal surfaces, which led to a decrease in microfouling by *S. aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa* PA01.

However, the phenomenon of biofilms can also be used in the creation of new agrobiotechnologies. Quorum sensing compounds may represent new active substances that can be used to prime plant seeds to increase the resistance of grain crops to pathogens and abiotic stress and increase yield. The positive effects of hexanoyl homoserine lactone (HHL) on the germination of winter wheat seeds *Triticum aestivum* L., plant development, and their productivity were investigated using two Ukrainian winter wheat varieties Volodarka and Yatran 60.

Keywords: biofilm, gram-negative bacteria, cellulose, amyloids, eDNA, quorum sensing, infection, biocides, antibiotic resistance, azithromycin, plant priming.