

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Влияние биогенных полиаминов на скольжение микобактерий в присутствии антибиотиков

И.В. Цыганов<sup>1, 2</sup>✉, А.Г. Ткаченко<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

<sup>2</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия  
✉ zamegagurrendan@gmail.com

**Аннотация.** Из всех известных способов передвижения бактерий скольжение является наименее изученным. Впервые описанное для микобактерий и некоторых других бактериальных видов, скольжение представляет собой пассивный способ перемещения по поверхности полужидких питательных сред у видов, лишенных оргanelл движения. Несмотря на отсутствие механизмов перемещения, некоторые микобактерии способны быстро колонизировать поверхности, в том числе ткани многоклеточных организмов, за счет присутствия в составе наружного слоя их клеточной стенки гликопептидолипидов, регулирующих силу трения о поверхность при перемещении. Это представляет серьезную проблему для эффективной терапии микобактериозов, вызываемых нетуберкулезными микобактериями. Кроме того, ткани многоклеточных животных содержат биогенные полиамины, которые способны повышать устойчивость микроорганизмов к различным стрессам, в том числе к антибиотикам, и модулировать коллективное движение. Поэтому исследование совместного действия биогенных полиаминов и антибиотиков на процессы распространения микобактерий представляет большой интерес для медицины. В качестве объектов исследования использованы штаммы микобактерий, включая родительский штамм *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, а также его производные, содержащие одинарную ( $\Delta rel_{Msm}$ ) или двойную ( $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$ ) хромосомные делеции. Содержание гликопептидолипидов определяли с помощью метода тонкослойной хроматографии. Интенсивность скольжения оценивали путем измерения площади скользящей колонии. Эффективность действия антибиотиков характеризовали сравнением площадей скользящих колоний в присутствии сопоставимых концентраций антибиотиков, выраженных в значениях, кратных минимальной подавляющей концентрации. Показано, что полиамины спермидин и спермин оказывают разнонаправленные эффекты на скольжение микобактерий по поверхностям полужидких сред, соответственно повышая или снижая площади колоний. При этом использовали концентрации спермидина и спермина, которые сами по себе не оказывали бактерицидный или бактериостатический эффект. Однако их совместное применение с антибиотиками стрептомицином или изониазидом приводило к снижению антибактериального эффекта, но усиливало действие синтетического аналога природного антибиотика эрогоргиаена (DMNP). Наиболее эффективным в этих условиях был рифампицин. Более того, нами установлено, что гликопептидолипиды, по-видимому, являются не единственными регуляторами скольжения микобактерий.

Ключевые слова: микобактерии; скольжение; антибиотикочувствительность; полиамины.

**Для цитирования:** Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Влияние биогенных полиаминов на скольжение микобактерий в присутствии антибиотиков. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):458-466. DOI 10.18699/VJGB-22-56

## Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics

I.V. Tsyganov<sup>1, 2</sup>✉, A.G. Tkachenko<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

<sup>2</sup> Perm State University, Perm, Russia  
✉ zamegagurrendan@gmail.com

**Abstract.** Nowadays, sliding is the least investigated mode of bacterial motility. Sliding is a process of passive movement on the surface of semi-liquid mediums which was originally described for mycobacteria and other bacterial species deprived of the organelles specialized for movement. Some mycobacteria are able to colonize surfaces, including tissues of macro-organisms, using glycopeptidolipids localized in the cell envelope for this aim. This is a serious problem for effective therapy of mycobacteriosis caused by nontuberculosis mycobacteria. Furthermore, animal tissues contain biogenic polyamines, which can increase tolerance of microorganisms to stresses, including antibiotics, and modulate cell motility. Therefore, studying mutual effects of biogenic polyamines and antibiotics on the expansion of mycobacteria is important for medicine. Mycobacterial strains, including the parent *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 and strains containing single ( $\Delta rel_{Msm}$ ) or double ( $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$ ) deletions, were used as the objects of this study. The content of glycopeptidolipids was determined using thin layer chromatography. Sliding motility was assessed by measuring the

area of the sliding colony. The effectiveness of antibiotics was measured by comparison of the areas of sliding colonies in the presence of comparable concentrations of antibiotics. The polyamines spermidine and spermine had different effects on the sliding of mycobacteria through an increase or decrease in the colony areas. At the same time, polyamines had neither bactericidal nor bacteriostatic effects. The polyamines contained in the medium decreased the bactericidal effects of the antibiotics streptomycin or isoniazid, but enhanced the effects of DMNP, a synthetic analogue of the natural antibiotic erogorgiaene. Rifampicin was the most effective of all antibiotics investigated here. Moreover, we found that glycopeptidolipids are, apparently, not the only regulators of mycobacterial sliding.

Key words: mycobacteria; sliding motility; antibiotic susceptibility; biogenic polyamines.

**For citation:** Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):458-466. DOI 10.18699/VJGB-22-56

## Введение

Скольжение – пассивный способ распространения бактерий по поверхностям полужидких сред, который был впервые описан в 1972 г. (Henrichsen, 1972). В основе механизма скольжения лежит действие экспансивной силы, возникающей при давлении друг на друга деформирующихся клеток. Бактерии толкают друг друга, распространяясь по поверхности в виде монослоя, а выделение клетками во внешнюю среду поверхностно-активных веществ (Нölscher, Kovács, 2017) или наличие гликопептидолипидов (ГПЛ) в составе клеточной стенки (Recht et al., 2000) препятствует скапливанию бактерий и образованию трехмерных структур. Поскольку скольжение возможно без участия таких органелл движения, как жгутики или пили, данный тип движения доступен видам, которые ранее считались неподвижными. Например, в 1999 г. было обнаружено, что считавшиеся неподвижными микобактерии способны скользить по полужидким средам (Martínez et al., 1999). Позднее была установлена связь между содержанием ГПЛ в клеточных стенках микобактерий и способностью к скольжению. Согласно этой модели, ГПЛ, расположенные на внешнем слое клеточной стенки, обращены гидрофобными «хвостами» во внешнюю среду, создавая гидрофобную поверхность клетки. Гидрофобные остатки жирных кислот в ГПЛ не взаимодействуют с гидрофильной поверхностью агаризованной среды, облегчая бактериям скольжение. Напротив, взаимодействие с гидрофобной поверхностью способствует прикреплению к субстрату, что подтверждается образованием биопленок на поливинилхлоридных иммунологических планшетах (Recht et al., 2000).

Таким образом, в настоящее время ГПЛ считаются ключевым фактором скольжения у микобактерий. Тем не менее на скольжение может влиять множество факторов внешней среды, например внеклеточные сигнальные молекулы. Для других типов коллективного движения, таких как подтягивание (twitching) или роение (swarming), уже открыты сигнальные молекулы, модулирующие движение, но не оказывающие бактерицидного действия. Так, внеклеточный АТФ, выделяемый поврежденными эпителиальными клетками, является сигнальной молекулой, ингибирующей подтягивающее движение *Pseudomonas aeruginosa* (Nolan et al., 2015), а полиамины (ПА) путресцин и спермидин, синтезируемые *Escherichia coli*, необходимы для инициации роения (Kurihara et al., 2009).

Роль полиаминов как сигнальных молекул имеет особое значение, поскольку данные поликатионы присутствуют

в клетках и тканях большинства живых организмов, а также в воде и почве. В крови, коже и слизистых оболочках человека тоже содержатся ПА, преимущественно кадаверин, спермидин и спермин, концентрация которых в отдельных случаях может достигать 2–10 мМ (Gugliucci, 2004). Бактерии, в свою очередь, синтезируют путресцин, кадаверин и спермидин. Гены синтеза ПА обнаружены в геноме микобактерий (Замахаев и др., 2018), но ранее нами было показано, что, в отличие от *E. coli*, микобактерии не синтезируют полиамины самостоятельно (Zamakhayev, 2020), однако способны транспортировать данные поликатионы из внешней среды. Полиамины обладают положительным зарядом, благодаря чему могут связываться с отрицательно заряженными молекулами в клетках, в первую очередь с нуклеиновыми кислотами, и влиять на репликацию, транскрипцию, трансляцию и другие внутриклеточные процессы. Бактерии, попадая на ткани, близкие по влажности к полужидкому агару, например слизистые оболочки, способны скользить по среде, богатой биогенными полиаминами, которые, в свою очередь, могут модулировать внутриклеточные процессы.

Исследование скольжения микобактерий представляет большой интерес, поскольку нетуберкулезные микобактерии, в составе клеточных стенок которых присутствуют ГПЛ, являются причиной инфекций легких и кожи (Tran et al., 2019). Осложняет проблему то, что нетуберкулезным инфекциям легких (НТИЛ) уделяется меньше внимания, вследствие чего показатели заболеваемости, вероятно, занижены, что не помешало НТИЛ превзойти заболеваемость туберкулезом в США (Strollo et al., 2015). Из-за отсутствия в клеточной стенке ГПЛ *Mycobacterium tuberculosis* в настоящее время считается не способным к скольжению. Тем не менее в клеточных стенках этого вида присутствуют фосфатидилинозитолманнозиды, фенольные гликолипиды, а также липоманнан и липоарабиноманнан (Tran et al., 2019). Перечисленные липиды тоже обладают способностью создавать гидрофобную среду, аналогичную той, что объясняет модель скольжения *M. smegmatis*.

Ранее нами показано, что синтетический аналог природного дитерпена эрогоргияена – DMNP, наряду с широко используемыми клиническими антибиотиками, обладает антимикобактериальной активностью. Его мишенями являются большая и малая алармон синтазы Rel<sub>Msm</sub> и RelZ, регулирующие внутриклеточный уровень алармона гуанозинтетрафосфата (p)ppGpp (Tkachenko et al., 2021),

что делает новое соединение эффективным против покоящихся клеток и перспективным веществом для разработки новых антимикобактериальных препаратов. Исходя из этого, предметом изучения стало возможное воздействие DMNP в отношении скользящих колоний *M. smegmatis*. Проведено сравнение нового соединения с широко применяемыми на практике антибиотиками рифампицином, стрептомицином и изониазидом, исследовано его влияние на антибиотикочувствительность микобактерий биогенных полиаминов как веществ, представленных в естественной среде и обладающих доказанным протекторным действием в отношении бактерий (Sarkar et al., 1995).

## Материалы и методы

### Объект исследования и условия культивирования.

Объектом исследования служили штаммы *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. В качестве контрольного использован родительский штамм без делеций генов, который обозначен на графиках как WT. Опытные штаммы с одинарной делецией гена  $\Delta rel_{Msm}$  и с двойной делецией генов  $\Delta rel_{Msm}\Delta relZ$  сконструированы на его основе сотрудником лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН Сидоровым Романом Юрьевичем (Tkachenko et al., 2021). Культуры хранились в чашках Петри с агаризованной средой Luria–Bertani (LB) (Sigma, США).

Для эксперимента культуру высевали на пробирку с 5 мл жидкой среды Middlebrook 7H9 (HIMEDIA, Индия), содержащей глицерин. Кроме того, среда содержала 25 мкг/мл ампициллина (ITW Reagents, США) и 0.05 % твин 80 («Росмедбио», Россия). Пробирку культивировали в течение 24 ч в термостатируемом шейкере (37 °С, 200 об/мин), после чего пересевали на колбу с 30 мл свежей среды и культивировали в аналогичных условиях до оптической плотности 2.0–2.4.

**Скольжение.** Скользящие колонии выращивали в пластиковых чашках Петри (40 мм). Жидкую среду Middlebrook 7H9 без глицерина агаризовали добавлением 0.3 % агарозы («Хеликон», Россия). Полиамины и антибиотики вносили в чашку предварительно, с последующим добавлением 3 мл остывшей до 47 °С жидкой агаризованной среды. Чашки сушили при комнатной температуре 24 ч. Культуру клеток разводили до оптической плотности 0.2 (ОП<sub>600</sub>), вносили в объеме 0.5 мкл в центр чашки Петри, после чего культивировали в термостате при 37 °С в течение 24 ч.

**Определение площади колонии.** Чашки с выросшими колониями фотографировали на камеру Olympus C-3040 ZOOM (Olympus, Япония). Площадь измеряли в бесплатной пробной версии Photoshop CC 2015.5 (Adobe, США), определяя площадь колонии в пикселях, а затем сравнивая с реальной площадью, соответствующей одному пикселю. Реальную площадь одного пикселя устанавливали, сравнивая диаметр чашки в пикселях с известным диаметром реальной чашки.

**Определение оптической плотности колонии.** Подробно метод описан в работе (Tkachenko et al., 2021). Для определения оптической плотности обесцвечивали ранее полученные фотографии колоний с помощью программы Photoshop CC 2015.5. Колонию выделяли с использованием инструмента «быстрое выделение», яркость оце-

нивали инструментом «гистограмма». Для инверсии освещенности учитывали яркость фона. На основе полученных значений яркостей фона считали среднее арифметическое и вычитали его из яркости колонии.

**Минимальную подавляющую концентрацию антибиотика** (МПК) определяли методом двукратных серийных разведений в иммунологических планшетах («Минимед», Россия). За МПК принимали минимальную концентрацию, при которой отсутствовал видимый рост клеточной культуры в лунке планшета.

### Определение содержания гликопептидолипидов.

Культуры клеток выращивали в течение 48 ч до стационарной фазы, что соответствовало времени выращивания биопленок. Оптическую плотность измеряли и доводили до ОП<sub>600</sub> = 1.5 в 40 мл. Клетки отмывали от питательной среды, помещали в 600 мкл смеси хлороформ:метанол (2:1) и выдерживали 2 ч в ультразвуковой ванне (ELMA, Германия) при температуре 56 °С. Фрагменты клеток отделяли от супернатанта центрифугированием (15 мин, 12000 об/мин). Супернатант отбирали и добавляли к нему дистиллированную воду (1:1), перемешивали и центрифугировали (1 мин, 12000 об/мин). Органическую фазу извлекали, а затем выпаривали. К высушенному остатку добавляли 100 мкл смеси хлороформ:метанол (9:1) и наносили в объеме 10 мкл на хроматографические пластины с силикагелем 60 (Merck, Германия). Пробы разделяли в системе хлороформ:метанол (9:1), после чего пластины высушивали и опрыскивали 10 % раствором серной кислоты в этаноле. Результат визуализировали обугливанием при температуре 180 °С в течение 90 с.

**Биопленки выращивали** в течение 48 ч в пластиковых чашках диаметром 40 мм («Медполимер», Россия). В чашки вносили 4.5 мл среды Middlebrook 7H9 без твин 80. Культуры клеток отмывали и вносили в объеме 500 мкл в чашки таким образом, чтобы конечная оптическая плотность клеток в чашке была равна 0.1 (ОП<sub>600</sub>). Результаты фиксировали фотографически.

### Микроскопия монослоя скользящих колоний.

Скользящие колонии наблюдали при помощи оборудования для фазового контраста ФАТЕК 6-7 («ЛОМО», Россия) на микроскопе МИКМЕД-6 («ЛОМО»). Результаты фиксировали на камеру для микроскопа МС 6.3 («ЛОМО»).

**Статистическая обработка результатов** выполнена в пакете стандартных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). На графиках отражены медианы (значения 4–10 экспериментов), вертикальными отрезками обозначены величины первого и третьего квартилей. Оценка статистической значимости различий произведена с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при  $p \leq 0.05$ .

## Результаты

### Зависимость скольжения от генотипа штаммов микобактерий

В ходе исследования было установлено, что все штаммы имели возможность скользить и формировать монослой клеток (рис. 1). При этом родительский штамм без делеций формировал колонию, площадь которой была заметно меньше, чем площадь колонии штамма с делецией гена

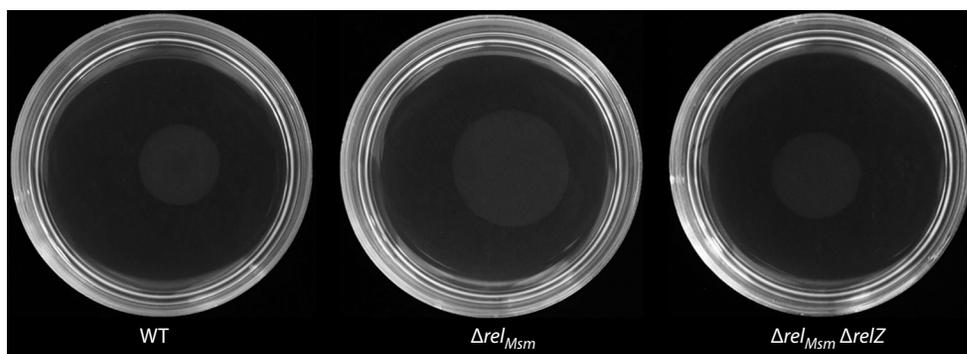


Рис. 1. Скольжение штаммов микобактерий.

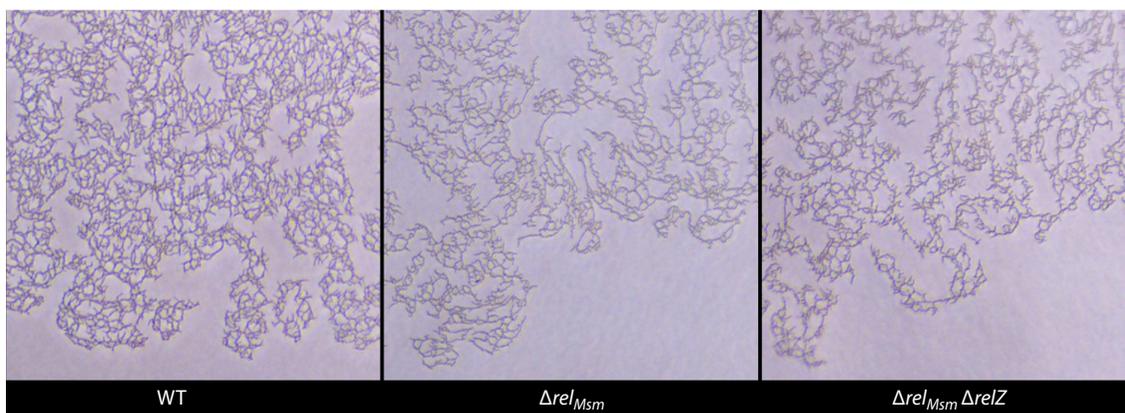


Рис. 2. Край монослоя скользящих колоний.

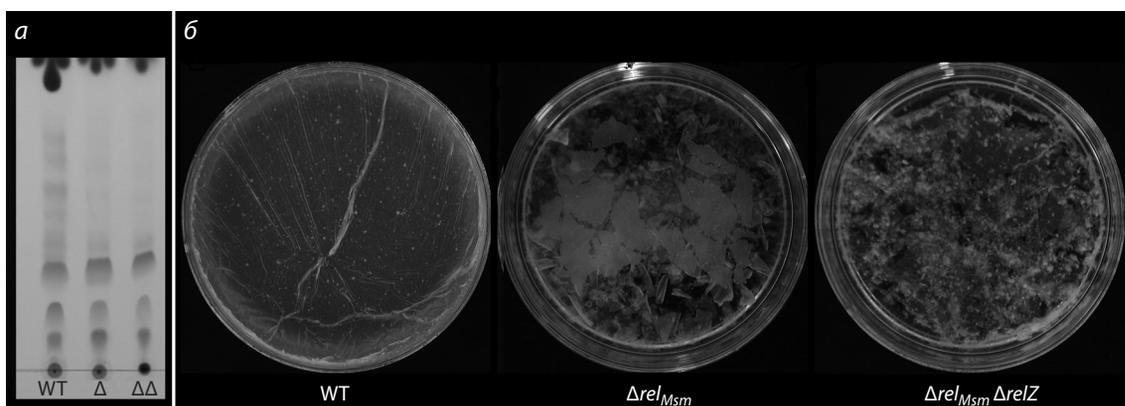


Рис. 3. Зависимость между гидрофобностью поверхностной биопленки и содержанием гликопептидолипидов в клетках. Влияние активности генов *relMsm* и *relZ* на количество ГПЛ в клетках *M. smegmatis* (a) и на биопленкообразование *M. smegmatis* (б). Δ – штамм с делецией гена *relMsm*; ΔΔ – штамм с двойной делецией генов *relMsm* и *relZ*.

$\Delta rel_{Msm}$ , но незначительно отличалась от штамма с двойной делецией  $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$ .

Исследование края колоний при помощи микроскопии методом фазового контраста подтвердило первоначальный вывод, сделанный на основе сравнения площадей колоний: клетки штаммов с делециями генов располагались менее плотно по сравнению с родительским штаммом (рис. 2). Данный факт свидетельствует о том, что делеционные штаммы скользили лучше, чем родительский.

При исследовании содержания гликопептидолипидов в клеточных стенках микобактерий оказалось, что родительский штамм содержал наибольшее количество ГПЛ (рис. 3, a). Мутантные штаммы продемонстрировали уменьшение количества ГПЛ прямо пропорционально росту числа делеций. Тем не менее уменьшение количества ГПЛ в клеточных стенках делеционных штаммов не приводило к уменьшению площади скользящих колоний (см. рис. 1). Этот факт может говорить о том, что либо ГПЛ не

участвуют в формировании гидрофобной поверхности, облегчающей скольжение, либо помимо ГПЛ существуют другие регуляторы скольжения, модулирующие свойства клеточной поверхности и влияющие на скольжение.

Данные о содержании ГПЛ были сопоставимы с полученными нами ранее результатами по биооплообразованию микобактерий (Tkachenko et al., 2021), а также согласуются с информацией о связи между количеством ГПЛ в клеточной стенке и степенью гидрофобности бактериальной поверхности (Recht et al., 2000). Согласно модели скольжения микобактерий, ГПЛ формируют гидрофобную клеточную поверхность микобактерий, которая позволяет успешно скользить по гидрофильным средам. Наши исследования показали (см. рис. 3, б), что клетки родительского штамма, благодаря присутствию в их поверхностных структурах достаточно большого количества ГПЛ, были способны формировать поверхностные биопленки, удерживаемые на водной поверхности, которые не опускались на дно даже после нарушения целостности биопленки.

В отличие от этого, штамм с одной делецией  $\Delta rel_{Msm}$  содержал меньше ГПЛ, и, соответственно, помимо дефектов в биооплообразовании, связанных с нарушением активности гена алармон синтетазы, фрагменты биопленок обладали меньшей гидрофобностью и частично погружались на дно чашки. Штамм же с двойной делецией  $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$  характеризовался наименьшим количеством ГПЛ в клеточной стенке, и вследствие наименьшей гидрофобности поверхности относительно других штаммов фрагменты его поверхностной биопленки полностью опускались на дно чашки (см. рис. 3, б). Поскольку измерение биомассы поверхностных биопленок показало отсутствие статистически значимых различий между штаммами (Tkachenko et al., 2021), такое фазовое распределение фрагментов биопленки зависело в первую очередь от гидрофобности клеток, а не от массы фрагментов.

#### Влияние полиаминов на скольжение

При последующем исследовании скольжения и статистической обработке данных были получены результаты, подтверждавшие статистически значимое превосходство площадей скользящих колоний штамма с одинарной делецией гена  $rel_{Msm}$ . Площади колоний, образуемые штаммом с двойной делецией, статистически не превышали площадь колоний родительского штамма (рис. 4). Внесение в среду скольжения биогенных полиаминов спермидина и спермина как наиболее характерных для тканей многоклеточных организмов вызывало разнонаправленный эффект. Спермидин способствовал значительному увеличению площадей колоний у родительского штамма и штамма с одной делецией, тогда как спермин статистически значимо снижал площадь скользящих колоний. Эффект был прямо пропорционален числу делеций в штаммах (см. рис. 4).

Как известно, оба использованных нами вида полиаминов обладают положительным зарядом благодаря наличию amino- и иминогрупп (Gugliucci, 2004). Тем не менее они оказывали разнонаправленное действие на скольжение. В этом случае эффект полиаминов невозможно объяснить одним лишь влиянием на поверхностный заряд клетки. Полученное нами снижение площади колоний в результа-

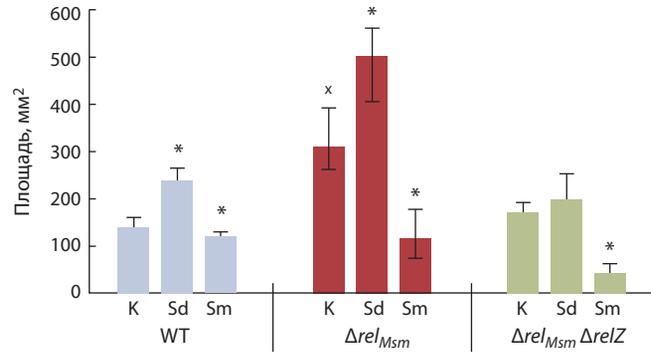


Рис. 4. Влияние полиаминов на скольжение штаммов *M. smegmatis*.

K – контроль без добавки полиаминов; Sd – спермидин, 2 мМ; Sm – спермин, 2 мМ. Статистически значимое отличие (критерий Манна–Уитни,  $p \leq 0.05$ ): \* от контрольной колонии того же штамма, выращенной на среде без добавки полиаминов; <sup>x</sup> от контрольной колонии штамма без делеций генов (WT), выращенной на среде без добавки.

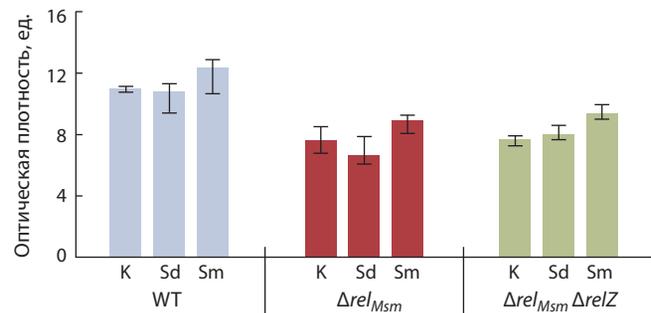


Рис. 5. Влияние полиаминов на оптическую плотность скользящих колоний *M. smegmatis*.

K – контроль без добавки полиаминов; Sd – спермидин, 2 мМ; Sm – спермин, 2 мМ.

те действия спермина можно было бы интерпретировать его вероятным бактериостатическим эффектом. Однако ранее показано, что использованные нами концентрации полиаминов не оказывали эффекта на скорость роста и жизнеспособность микобактерий в жидкой культуре (Цыганов и др., 2017).

Чтобы получить дополнительную информацию о влиянии полиаминов на биомассу скользящих колоний микобактерий, мы попытались оценить оптическую плотность или численность клеток в культуре, полученной количественным смывом колонии заданным объемом среды. Однако вследствие гидрофобности поверхности микобактерий, выросших на среде без твин 80, не представлялось возможным полностью разделить их между собой, а также отделить от остатков агаризованной среды. Поэтому косвенную оценку биомассы колоний проводили измерением величины яркости колоний на фотографиях, т. е. оптической плотности, стандартизированной относительно фоновых значений плотности окружающей колонии среды (рис. 5). По результатам измерения установлено, что изменение площадей скользящих колоний обусловлено исключительно эффектом полиаминов на скольжение и никак не связано с возможностью их бактериостатического или бактерицидного действия (см. рис. 5).

Статистически значимое изменение площадей колоний в присутствии полиаминов (см. рис. 4) не сопровождалось изменением биомассы скользящих колоний, выраженной через оптическую плотность (см. рис. 5). Это подтверждает вывод о том, что полиамины спермидин и спермин не оказывали бактерицидного или бактериостатического эффекта. Различия в оптической плотности между родительским штаммом и штаммами с делециями генов объясняются сопутствующим изменением ростовых характеристик, вызванных изменением генотипа опытных штаммов *M. smegmatis* относительно родительского.

### Влияние полиаминов на скольжение в присутствии антибиотиков

Для исследования влияния антибиотиков на скольжение микобактерий были подобраны сублетальные концентрации, которые статистически значимо уменьшали площади скользящих колоний. Для сравнительного анализа антибиотиков все использованные концентрации выражены в значениях кратностей минимальной подавляющей концентрации соответствующего антибиотика, которая была определена предварительно.

При сравнении эффективности антибиотиков установлено, что рифампицин сильнее всех способствовал уменьшению площади скользящих колоний всех трех штаммов микобактерий, тогда как стрептомицин и изониазид обладали приблизительно одинаковой эффективностью (рис. 6–8). DMNP демонстрировал наименьший антибактериальный эффект в отношении растущих скользящих колоний, что обусловлено его действием прежде всего в

отношении клеток стационарной фазы (Tkachenko et al., 2021), тогда как в активно растущей колонии бактерии преимущественно находятся в состоянии роста.

Кроме того, поскольку DMNP растворяется в метаноле, мы исследовали влияние метанола на скольжение микобактерий. Показано, что при добавлении в среду метанола в объеме, использованном при добавлении DMNP (50 мкл), площади колоний превосходили значения, полученные в контроле без добавления метанола (см. рис. 6–8). При совместном действии спермина и минимальных концентраций рифампицина и стрептомицина наблюдалась картина, аналогичная действию данного полиамина в отсутствие антибиотиков: площади колоний были меньше контрольных, выросших на среде с антибиотиком, но без полиамина (см. рис. 6).

Эффект полиаминов значительно изменялся при максимальных концентрациях антибиотиков. В присутствии DMNP колонии, выросшие на среде без полиаминов, превосходили те, что выросли на среде со спермидином и спермином. Совместное действие DMNP и обоих полиаминов повышало эффект уменьшения площади скольжения до уровней, близких к значениям эффективности антибиотиков стрептомицина и изониазида в отсутствие ПА. В то же время площади колоний, выросших на среде с добавлением полиаминов и максимальными концентрациями стрептомицина или изониазида, были больше, чем площадь контрольных колоний в отсутствие обоих ПА, что можно объяснить их протекторными свойствами. Таким образом, в присутствии полиаминов эффект уменьшения площади скользящих колоний DMNP превосхо-

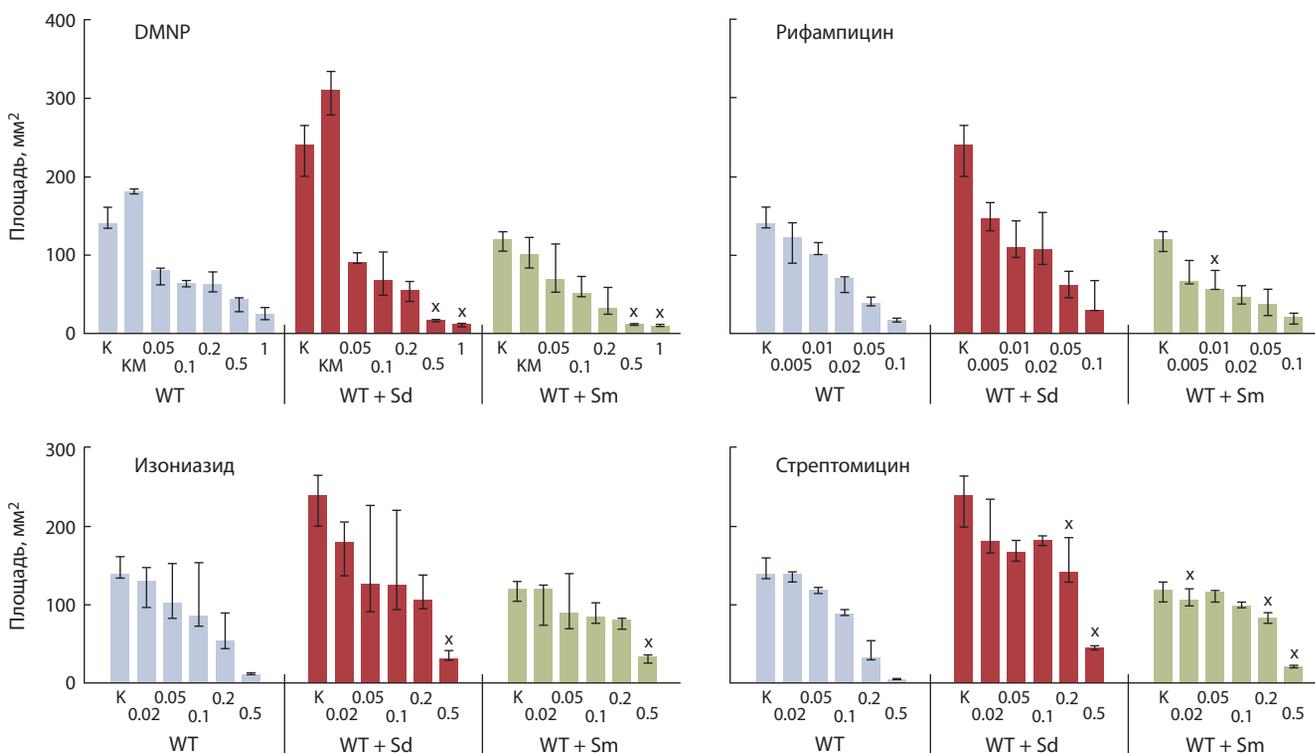


Рис. 6. Совместное влияние полиаминов и антибиотиков на скольжение штамма *M. smegmatis* без делеций.

Здесь и на рис. 7 и 8: KM – контроль с добавкой 50 мкл метанола; Sd – спермидин, 2 мМ; Sm – спермин, 2 мМ.

x Статистически значимое отличие от аналогичной контрольной колонии без ПА (критерий Манна–Уитни,  $p \leq 0.05$ ).

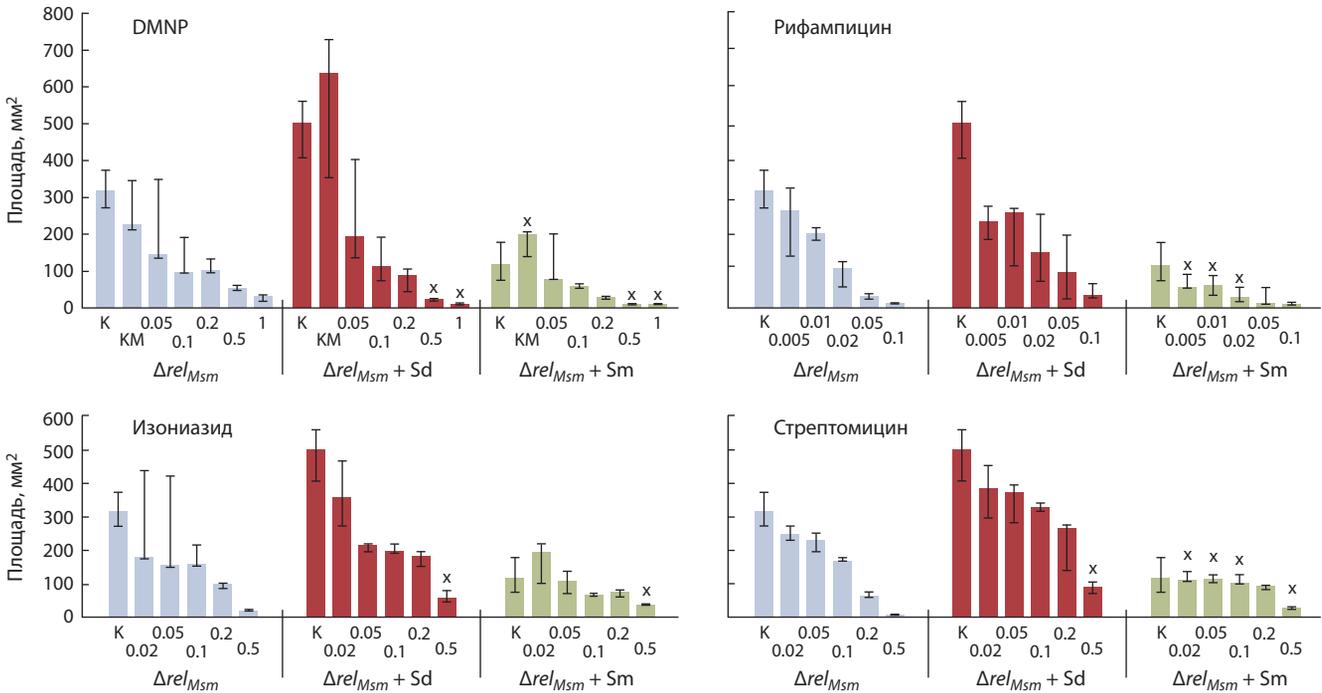


Рис. 7. Совместное влияние полиаминов и антибиотиков на скольжение штамма *M. smegmatis* с делецией гена  $rel_{Msm}$ .

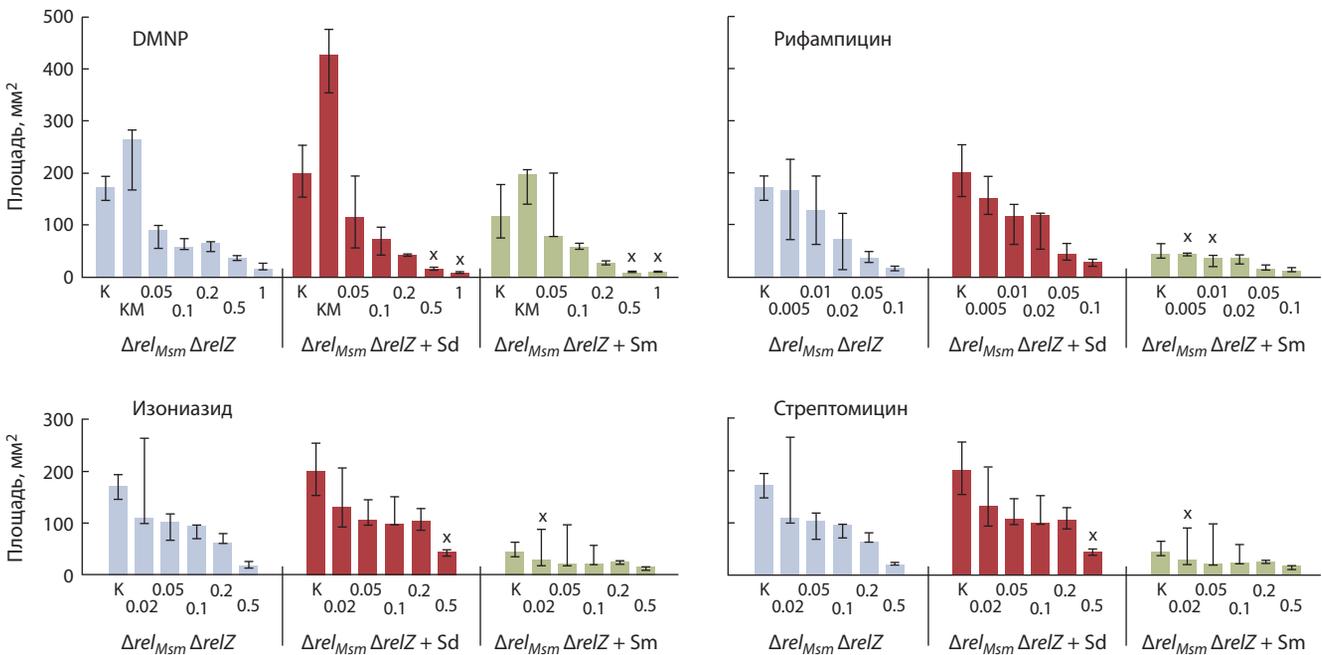


Рис. 8. Совместное влияние полиаминов и антибиотиков на скольжение штамма *M. smegmatis* с двойной делецией генов  $rel_{Msm}$  и  $relZ$ .

дил эффект таких антибиотиков, как стрептомицин и изониазид. Рифампицин сильнее всех способствовал уменьшению площадей колоний штамма без делеций, несмотря на то что в присутствии спермидина эффективность максимальных концентраций антибиотика тоже снижалась (см. рис. 6).

Аналогичная картина наблюдалась для штамма с делецией гена  $rel_{Msm}$  (см. рис. 7). Наибольший антибактериальный эффект демонстрировал рифампицин. Спермин

статистически достоверно ограничивал площадь скользящих колоний, усиливая антибактериальное действие минимальных концентраций стрептомицина и рифампицина. Эффективность DMNP возрастала в присутствии обоих полиаминов и, таким образом, превосходила антибактериальный эффект изониазида и стрептомицина при максимальных концентрациях (см. рис. 7).

Совместное действие спермидина и антибиотиков на штамм с двойной делецией генов  $rel_{Msm}$  и  $relZ$  было ана-

логичным описанному выше (см. рис. 8). В то же время добавление спермина ограничивало скольжение микобактерий при минимальных концентрациях изониазида, стрептомицина и рифампицина. Антибиотик DMNP в присутствии обоих полиаминов сильнее уменьшал площади скольжащих колоний, но на среде без добавок спермидина и спермина эффективность DMNP была ниже, чем у остальных антибиотиков.

## Обсуждение

Ключевыми факторами скольжения как пассивного способа движения являются поверхностно-активные вещества, присутствующие в составе клеточных стенок бактерий или выделяемые ими во внешнюю среду. Ранее основными из них считались гликопептидолипиды, которые встроены в клеточную стенку и необходимы микобактериям для скольжения. Однако данные исследований, выполненных нами на штаммах *M. smegmatis*, дефицитных по ГПЛ клеточной стенки (см. рис. 3, б), показали, что образуемые ими колонии превосходят площадь колоний родительского штамма в 1.5–2 раза или не уступают им по площади, несмотря на замедленный рост. Отличием проведенного нами исследования является то, что опытные штаммы с делециями не прекращали полностью синтезировать ГПЛ. Несмотря на это, из-за дефицита ГПЛ гидрофобность клеточной поверхности делеционных штаммов была ниже, чем у родительского, что косвенно подтвердилось при изучении характера дефектов в биопленкообразовании у делеционных штаммов *M. smegmatis* (см. рис. 3, б). Полученные нами результаты позволяют предположить, что ГПЛ – не единственные регуляторы скольжения микобактерий. Для определения полной картины механизма скольжения необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение роли других липидов, входящих в состав клеточной стенки *M. smegmatis* и участвующих в этом процессе.

Разнонаправленность эффекта различных полиаминов на диаметр скольжащих колоний не может быть объяснена только их влиянием на электроотрицательность клеточной поверхности, поскольку оба изученных полиамина имеют положительный заряд. В то же время уменьшение площадей колоний, вызванное спермином, не относится к проявлению антибактериального эффекта и не сопровождается изменением биомассы. Это позволяет предположить, что полиамины способны модулировать скольжение, регулируя внутриклеточные процессы (возможно, выступая в качестве сигнальной молекулы) или напрямую через изменение состава клеточной стенки. Определение механизмов скольжения нуждается в дальнейшем исследовании.

Совместное действие полиаминов и антибиотиков показало, что рифампицин – наиболее эффективный препарат против активно делящихся клеток в колонии. Антибиотик DMNP проявлял наименьшую активность в отношении скольжащих колоний на среде без полиаминов. Тем не менее в присутствии 2 мМ спермидина или спермина эффект антибиотика усиливался независимо от штамма микобактерий и превосходил эффективность стрептомицина и изониазида в аналогичных условиях. Полиамины демонстрировали протекторное действие при максимальных концентрациях стрептомицина и изониазида.

Защитная функция полиаминов была известна ранее (Sarkar et al., 1995). Однако, согласно полученным нами результатам, при минимальных концентрациях рифампицина и стрептомицина наблюдался эффект ограничения скольжения в присутствии спермина. Усиление действия DMNP в присутствии полиаминов обеспечивает данному антибиотику преимущество перед широко используемыми препаратами, поскольку в клетках и тканях многоклеточных находятся полиамины, которые способны влиять на эффективность антибактериальных препаратов.

## Заключение

В ходе исследования установлено, что биогенные полиамины спермидин и спермин способны модулировать скольжение микобактерий и демонстрируют разнонаправленный эффект на этот процесс. Спермин сдерживал скольжение при минимальных концентрациях стрептомицина и рифампицина. В то же время оба полиамина усиливали влияние DMNP на диаметр колоний, делая его более эффективным по сравнению со стрептомицином и изониазидом в аналогичных условиях. Показано, что гликопептидолипиды, по-видимому, являются не единственным регулятором скольжения микобактерий. Поэтому исследование механизмов скольжения и природы влияния полиаминов на данный процесс требует дальнейшего изучения.

## Список литературы / References

- Замахаев М.В., Григоров А.С., Капрельянц А.С., Шумков М.С. *Mycobacterium smegmatis* обладает активными генами метаболизма полиаминов. *Вестн. Перм. ун-та. Сер. Биология*. 2018;3: 284-291. DOI 10.17072/1994-9952-2018-3-284-291.
- [Zamakhayev M.V., Grigorov A.S., Kaprel'yants A.S., Shumkov M.S. *Mycobacterium smegmatis* possesses active genes of polyamine metabolism. *Vestnik Permskogo Universiteta. Biologiya = Bulletin of the Perm University. Series: Biology*. 2018;3:284-291. DOI 10.17072/1994-9952-2018-3-284-291. (in Russian)]
- Цыганов И.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Участие полиаминов в регуляции «поведенческих» реакций микроорганизмов. В: История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований. Сб. науч. тр. по материалам науч. конф., посвящ. 100-летию кафедры физиологии растений и микроорганизмов Перм. гос. нац. исслед. ун-та, Пермь, 18–19 окт. 2017 года. Пермь: Перм. гос. ун-т, 2017:111-112.
- [Tsyganov I.V., Nesterova L.Yu., Tkachenko A.G. Involvement of polyamines in the regulation of “behavioral” reactions of microorganisms. In: History and Methodology of Physiological, Biochemical and Soil Research: Proceedings of the Conference dedicated to the 100th anniversary of the Department of Plant Physiology and Microorganisms, Perm State National Research University, Perm, October 18–19, 2017. Perm: Perm State University, 2017:111-112. (in Russian)]
- Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin. Chim. Acta*. 2004;344(1-2):23-35. DOI 10.1016/j.cccn.2004.02.022.
- Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 1972;36(4):478-503. DOI 10.1128/br.36.4.478-503.1972.
- Hölscher T., Kovács Á.T. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ. Microbiol.* 2017;19(7):2537-2545. DOI 10.1111/1462-2920.13741.
- Kurihara S., Suzuki H., Tsuboi Y., Benno Y. Dependence of swarming in *Escherichia coli* K-12 on spermidine and the spermidine importer. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009;294(1):97-101. DOI 10.1111/j.1574-6968.2009.01552.x.

- Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 1999;181(23):7331-7338. DOI 10.1128/JB.181.23.7331-7338.1999.
- Nolan L.M., Cavaliere R., Turnbull L., Whitchurch C.B. Extracellular ATP inhibits twitching motility-mediated biofilm expansion by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2015;15:55. DOI 10.1186/s12866-015-0392-x.
- Recht J., Martínez A., Torello S., Kolter R. Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 2000;182(15):4348-4351. DOI 10.1128/JB.182.15.4348-4351.2000.
- Sarkar N.K., Shankar S., Tyagi A.K. Polyamines exert regulatory control on mycobacterial transcription: a study using RNA polymerase from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995;35:1189-1198.
- Strollo S.E., Adjemian J., Adjemian M.K., Prevots D.R. The burden of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in the United States. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2015;12(10):1458-1464. DOI 10.1513/AnnalsATS.201503-173OC.
- Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tsyganov I.V., Vaganov V.Y., Shipilovskikh S.A., Rubtsov A.E., Malkov A.V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases. *Cell Chem. Biol.* 2021;28(10):1420-1432.e9. DOI 10.1016/j.chembiol.2021.01.018.
- Tran T., Bonham A.J., Chan E.D., Honda J.R. A paucity of knowledge regarding nontuberculous mycobacterial lipids compared to the tubercle bacillus. *Tuberculosis (Edinb).* 2019;115:96-107. DOI 10.1016/j.tube.2019.02.008.
- Zamakhayev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycobacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines. *Int. J. Mycobacteriol.* 2020;9(2):138-143. DOI 10.4103/ijmy.ijmy\_48\_20.

---

#### ORCID ID

I.V. Tsyganov orcid.org/0000-0002-5030-7997  
A.G. Tkachenko orcid.org/0000-0002-8631-8583

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 18-73-10156.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.03.2022. После доработки 04.05.2022. Принята к публикации 13.05.2022.