

**Абдулкадиева Марьям Махдиевна**

**АНАЛИЗ И ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАТТЕРНОВ ПРИПОВЕРХНОСТНОГО  
ДВИЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ В МИКРОФЛЮИДИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) и федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (ФГАОУ ВО "РУДН им П. Лумумбы").

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук Сысолятина Елена Владимировна, в.н.с., зав. лабораторией онтогенеза и коррекции системы интерферона ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

**Научный консультант:**

доктор химических наук, профессор Станишевский Ярослав Михайлович, директор Института биохимических технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО "РУДН им П. Лумумбы"

**Официальные оппоненты:**

- **Марданова Айслу Миркасымовна**, д.б.н., проф., профессор кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

- **Ткаченко Александр Георгиевич**, д.м.н., проф., зав. лабораторией адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится «07» февраля 2025 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org/>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
д.б.н.

Ермолаева С.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Подвижность микроорганизмов является их важной видовой характеристикой. Наличие органелл передвижения (флагелл) позволяет свободноживущим бактериям эффективно расселяться, а патогенным реализовывать вирулентность, то есть адгезироваться на поверхности, колонизировать ее, а в случае с внутриклеточными паразитами, например, листериями, проникать в клетку-хозяина (Belas et al., 2014).

Такие исследователи, как Berg с коллегами, посвятившие десятки лет изучению характера движения бактерий и механизмов, лежащих в его основе, подготовили почву для бурного развития новой отрасли науки, стоящей на стыке микробиологии, физики и математического моделирования, биофизике коллективного поведения микроорганизмов (Berg et al., 1973, Berg et al., 1979, Wadhwa et al., 2019). Подвижные бактерии с физической точки зрения представляют собой активные броуновские частицы, способные преобразовывать энергию, получаемую извне, в собственную кинетическую энергию движения (Bechinger et al., 2016). Исходя из этого, суспензии подвижных бактерий являются частным случаем активных сред, которые могут быть охарактеризованы только методами неравновесной физики (Bechinger et al., 2016). В последние годы опубликовано большое количество работ, описывающих, в том числе математически, особенности перемещения подвижных микроорганизмов в зависимости от условий, в которых они находятся (Molaei et al., 2014). Основными объектами для изучения подвижности стали *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes*.

Большинство исследователей использовали *E. coli* как наиболее хорошо охарактеризованный подвижный вид, простой в культивировании и включающий широкий спектр штаммов от безопасных лабораторных до патогенных (Makarchuk et al., 2019,). Было установлено, что при приближении к твердой поверхности траектории бактерий кишечной палочки дикого типа изменялись с типичных «пробег-кувырок» и «медленного хаотичного перемещения» на круговое движение или ориентированное параллельно поверхности ии (Molaei et al., 2014, Lauga et al., 2006). Было выдвинуто предположение, что круговое «непродуктивное» движение может быть важным для эффективной колонизации и, следовательно, выживания в окружающей среде и организме хозяина (Perez et al., 2019).

Предполагается, что микроорганизмы, имеющие одинаковые размерные и структурные характеристики, например, являющиеся грамотрицательными перитрихами, как кишечная палочка, должны иметь сходные модели движения. Однако штаммы кишечной палочки морфологически и физиологически сильно различаются между собой. Например, лабораторный штамм *E. coli* JM109 является слабоподвижным, а его родительский штамм K-12 не имеет фимбрий, необходимых для колонизации поверхности кишечника человека (Lymberopoulos et al., 2006). Успешно заселяющий кишечник патогенный штамм кишечной палочки ЕНЕС O157:H7 для адгезии использует длинные полярные фимбрии (LPF), более короткие образования, чем жгутики (Zhou et al., 2019).

Полногеномным секвенированием было установлено 14 локусов LPF, из них 10 консервативные, а 4 уникальны для штамма *E. coli* O157:H7. Было установлено, что экспрессия *lpf1* оперона STEC O157:H7 в штамме *E. coli*, лишенном фимбрий, приводила к увеличению его адгезии к HeLa and MDCK клеткам (Torres et al., 2005). Тем не менее несмотря на то, что EHEC O157 прекрасно колонизирует кишечник, он хуже, чем дикие типы образует биопленки (Visvalingam et al., 2017).

Таким образом, патогенные и непатогенные штаммы кишечной палочки значительно отличаются по подвижности и способности к адгезии, что позволяет предположить, что модели, которые описывают движение бактерий в зависимости от их формы и наличия жгутиков на примере непатогенных микроорганизмов, могут не являться адекватными и прогностическими для бактерий, являющихся факультативными паразитами. Для этих микроорганизмов может быть важным изменение в характере движения в зависимости от условий, в которых они находятся: во внешней среде или в организме хозяина. Ярким примером различного поведения микроорганизмов в зависимости от условий окружающей среды являются внутриклеточные паразиты листерии. При температуре окружающей среды до 30°C они, являясь перитрихами, как и кишечная палочка, перемещаются при помощи флагелл, но при повышении температуры до 37°C прекращают синтез флагеллина, лишаются жгутиков, и для внутриклеточного перемещения полимеризуют актин клетки-хозяина (Tilney et al., 1989). Потеря листериями подвижности в организме хозяина не является критичной для реализации патогенности. Благодаря белкам интерналинам они вызывают индуцированный фагоцитоз клетками-мишенями. Для внеклеточных паразитов, например, таких, как *E. coli* EHEC, для адгезии к эукариотическим клеткам необходимо более специфическое взаимодействие с рецепторами, которое должно быть тем более эффективным, чем подвижнее микроорганизм. Вероятно, поведение подвижных патогенных и непатогенных близкородственных микроорганизмов вблизи поверхности может различаться в зависимости от параметров среды, приводя к различной эффективности адгезии к клеткам-мишеням и абиотическим поверхностям. В связи с этим установление роли траекторий движения патогенных и свободноживущих бактерий в адгезии и колонизации биотических и абиотических поверхностей является фундаментальной, а задача сравнения траекторий движения близкородственных пар патоген/непатоген в зависимости от удаленности от поверхности и изменения параметров среды, математический анализ траекторий и связь особенностей движения с эффективностью адгезии и колонизации, по нашим данным, ставится впервые.

В связи с вышесказанным нами была сформулирована следующая **цель работы**: выявление закономерностей в характере приповерхностного движения бактерий в условиях их взаимодействия с абиотическими поверхностями и эукариотическими клетками.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Разработать систему анализа паттернов приповерхностного движения бактерий для оценки их жизнеспособности и характера адаптации к условиям окружающей среды;

2. Валидировать разработанную систему на подвижных микроорганизмах *E. coli* и *L. monocytogenes* при разных параметрах окружающей среды (вязкости, концентрации бактерий);

3. Оценить связь паттернов приповерхностного движения с адаптацией *E. coli* к колонизации биотической поверхности на примере энтеропатогенного штамма *E. coli* ATCC34890 и пробиотического штамма *E. coli* M17;

4. Установить связь паттернов приповерхностного движения с эффективностью адгезии и инвазии патогенных и непатогенных для человека видов листерий на примере *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*;

5. Оценить возможность практического применения системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий для прогнозирования уровня антибиотикоустойчивости и других характеристик подвижных патогенных микроорганизмов (вирулентности, биобезопасности).

#### **Научная новизна.**

Впервые на примере штаммов кишечной палочки показано, что направленное коллективное движение сапрофитического штамма *E. coli* M17 в приповерхностном слое коррелировало с увеличением уровня адгезии и формированием скоплений бактерий в межклеточном пространстве, что повышало эффективность колонизации биотической поверхности. Для энтерогеморрагического штамма *E. coli* ATCC43890 было показано движение преимущественно в вертикальной плоскости и короткое время нахождения в слое, что могло приводить к более эффективному поиску рецепторов для взаимодействия с эукариотической клеткой и реализации патогенных свойств. Установлено, что все виды используемых в работе листерий (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) имели сходные паттерны приповерхностного движения и высокие средние скорости (17-27 мкм/с). Подвижность также коррелировала с образованием скоплений бактерий в области межклеточных контактов, что для патогенного для человека и животных вида *L. monocytogenes* означает локализацию в зоне повышенной концентрации необходимых для инвазии рецепторов E-кадгерина и C-Met. Это приводило к повышению эффективности инвазии в 8 раз. Получены данные о возможности использования разработанной системы анализа паттернов приповерхностного движения для прогнозирования антибиотикорезистентности.

#### **Практическая значимость**

Разработана система анализа движения бактерий, позволяющая получать данные о средней и медианной скорости перемещения микроорганизмов, среднем времени нахождения в слое, траекториях движения, наличии коллективного/направленного движения. Установлено, что данный подход может применяться как для получения фундаментальных данных о вкладе подвижности в адгезию и инвазию микроорганизмов, в том числе патогенных для человека, так и для экспресс-диагностики чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Фундаментальные сведения о вкладе паттернов подвижности в адгезию и инвазию бактерий используются в курсе лекций для аспирантов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России.

### **Методология и методы исследования**

Методологией исследования является создание системы, позволяющей анализировать паттерны подвижности микроорганизмов и использование её для поиска связи между особенностями движения близкородственных патогенных и непатогенных бактерий и их способностью к адгезии и инвазии. В работе использовались математические, бактериологические, культуральные, микроскопические, иммуноферментные методы. Данные обрабатывали с помощью компьютерного и статистического анализа.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Создана и валидирована система анализа паттернов приповерхностного движения микроорганизмов в микрофлюидических системах, позволяющая оценить средние скорости, время нахождения в слое, воссоздать траектории движения, наличие коллективного/направленного движения.

2. Выявлены различия в паттернах подвижности штаммов *E. coli*: энтерогеморрагического штамма O157:H7 и пробиотического штамма M17, обеспечивающие различия в паттернах колонизации поверхности эпителиальных клеток HEp-2

3. Подвижные листерии четырех видов имели сходные паттерны приповерхностного движения и рисунок адгезии, характеризующийся скоплением бактерий в местах межклеточных контактов, что для патогенного для человека и животных вида *L. monocytogenes* приводило к повышению эффективности инвазии в 8 раз.

4. Разработанная система позволяла детектировать изменения в характеристиках подвижности чувствительных к гентамицину *L. monocytogenes* и *P. aeruginosa* уже после 30 и 90 минут инкубации в среде с антибиотиком, соответственно, что закладывает основы дальнейшей разработки экспресс-диагностики антибиотикочувствительности подвижных микроорганизмов на основе системы анализа паттернов приповерхностного движения.

### **Личный вклад автора**

Разделы: характеристика эффективности адгезии к пластику подвижные и неподвижные штаммов *E. coli*; оценка влияния подвижности *E. coli* на эффективность адгезии к клеткам человека линии HEp-2; оценка эффективности адгезии подвижных *Listeria spp*; оценка инвазии подвижных и неподвижных *L. monocytogenes*; применение разработанной системы для экспресс-оценки антибиотикочувствительности *L. monocytogenes* были выполнены автором лично.

Разделы: разработка и валидация прототипа системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий; анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*; установление характеристик подвижности штаммов *E. coli* как активной среды; анализ рисунков адгезии патогенных и

сапрофитических штаммов *E. coli*; анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *Listeria spp.*; анализ профилей скоростей *L. monocytogenes* и *L. innocua* на стадии приповерхностного движения совместно с с.н.с. лаб. экологии возбудителей инфекций к.ф-м.н. Васильевой Е.В. и сотрудниками ОИВТ РАН д.ф-м.н. Васильевым М.М. и акад.РАН Петровым О.Ф.

Распределение подвижных и неподвижных бактерий *Listeria spp.* на поверхности клеток Нер-2 с помощью электронной микроскопии было установлено совместно с научными сотрудниками ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России к.м.н. Жуховицким В.Г., к.м.н. Шевлягиной Н.В., к.м.н. Андреевской С.Г.

На базе ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» были осуществлены все эксперименты, связанные с работой с патогенными микроорганизмами III-IV групп патогенности и проведен анализ паттернов подвижности. На базе ФГАОУ ВО РУДН проводился подбор условий для 3D печати микрофлюидических камер, валидация системы анализа паттернов подвижности в средах с разной вязкостью, микроскопия фиксированных препаратов.

### **Степень достоверности результатов и апробация работы**

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе цели и задачам. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в медико-биологических исследованиях 5%-ом уровне значимости (0,05)

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и международных научных конференциях: Ломоносов-2020, Российский микробиологический конгресс 2021, FEMS Conference on Microbiology 2022, Ломоносов-2023, XXV Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии - 2023, X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов - 2023, Материалы II Российского конгресса по медицинской микробиологии и инфектологии - 2024.

30 июня 2022 года было проведено заседание государственной экзаменационной комиссии по рассмотрению научно-квалификационной работы по направлению: 06.06.01. Биологические науки. 03.01.06 Биотехнология (в т.ч. биотехнология) в Российском университете дружбы народов.

В завершеном виде работа была апробирована и рекомендована к защите на совместной научной конференции отделов Медицинской микробиологии и Природноочаговых инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации «19» июля 2024 года.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.11 Микробиология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 5 и 12 паспорта специальности «Микробиология».

### **Публикации**

Основные положения диссертации изложены автором в 9 печатных работах, из них 1 статья в журнале базы данных РИНЦ, 2 статьи в рецензируемых журналах Scopus/WoS и рекомендованных ВАК для публикации к защите, все - по результатам экспериментальных исследований, 6 тезисов в сборнике трудов конференции, из них 1 в международном.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы (214 источников, из которых отечественных публикаций – 1, иностранных публикаций – 213). Работа содержит 5 таблиц и 32 рисунка.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Бактериальные штаммы и культуры клеток.** В работе были использованы штаммы *E. coli*: JM 109, ATCC43890, M17; виды рода *Listeria*: *L. monocytogenes* EGDc, *L. innocua* SLCC 33, *L. seeligeri* SLCC 5922, *L. ivanovii* ATCC 19119; клинические изоляты *P. aeruginosa* 1840 и Pa21 из коллекции лаборатории экологии возбудителей инфекции ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России. Оценку адгезии и инвазии в эукариотические клетки проводили на клетках аденокарциномы гортани человека линии HEp-2.

**Условия культивирования.** Штаммы *E. coli* рутинно выращивали на жидкой и твердой питательной среде Лурия–Бертани LB (Amresco, США) при 37°C. Культивирование бактерий рода *Listeria* проводили на в сердечно-мозговом бульоне (ВН) (Amresco, США). Для инкубации *L. monocytogenes* и *L. innocua* использовали температуру 25°C и 37°C.

Клетки HEp-2 культивировали в DMEM (Панэко, Россия) с добавлением фетальной бычьей сыворотки 10% от объема (GIBCO, США) без добавления антибиотиков при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Конструкция микрофлюидической камеры.** Для изучения движения бактерий на 3D принтере из прозрачной смолы (Anycubic Photon, Китай) были напечатаны микрофлюидические камеры. Они представляли собой модифицированную камеру Горяева с каналом глубиной 30 мкм и шириной 10 мм, к поверхности которой притирали покровное стекло.

**Анализ паттернов подвижности бактерий.** В микрофлюидическую камеру вносили бактериальную суспензию с OD<sub>600</sub> = 2,0, что соответствовало 10<sup>9</sup> клеток/мл, и

визуализировали передвижение бактерий при 400-кратном увеличении с использованием Zeiss Axio Scope A1, оснащенного цифровой камерой DCM510 (Китай), которая передавала видеоизображения с разрешением 1280x960 пикселей. Подготовка образца и наблюдение занимало примерно 10-15 минут, за это время снимали серию видеороликов продолжительностью 30 секунд со скоростью 30 кадров в секунду. Размер наблюдаемого поля зрения составлял  $\sim 81 \times 86 \text{ мкм}^2$ , глубина резкости составляла 5-10 мкм. Было записано не менее 5 видео для каждого образца, все эксперименты проводились 3 раза.

Разбивку полученных изображений на кадры, распознавание изображения и восстановление местоположения бактериальных клеток на кадре производили в программе Плазма 4.0. Последующий анализ данных, включающий покадровое определение координат для каждой бактериальной клетки и реконструкцию индивидуальных траекторий движения, производился в MATLAB R2018b. Данная работа выполнялась совместно с сотрудниками Объединённого института высоких температур РАН.

**Оценка подвижности в средах с различной вязкостью и концентрации.** Оценивали подвижность микроорганизмов в средах разной вязкости (PBS, 1% раствор метилцеллюлозы (МЦ), 2М раствор сахаразы) и при различных концентрациях бактерий (оптические плотности  $OD_{600} = 0,4; 2 \text{ и } 10$ ).

**Адгезия микроорганизмов к пластику.** Эффективность адгезии к абиотической поверхности оценивали в 24-луночной планшете из полиэтилентерефталата. Бактерии вносили в лунки, через 15, 30 и 60 мин инкубации жидкость удаляли и лунки трижды промывали стерильным PBS, после чего делали смыв адгезировавшихся бактерий при помощи стерильной ватной палочки. Далее производили серию десятикратных разведений с последующими высевами на твердую питательную среду. По истечении 18 часов инкубации в термостате при  $37^\circ\text{C}$  подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ).

**Адгезия *E. coli* к клеткам HEp-2.** Клетки высевали в 24-луночный планшет и при достижении среднего числа 300 000 клеток/лунка питательную среду заменяли на 1 мл суспензии *E. coli* соответствующего штамма в соотношении 1:100 (100 бактерий на 1 эукариотическую клетку). Через 15, 30 и 60 минут инкубации бактериальную суспензию удаляли, а поверхность лунок трижды промывали стерильным PBS. Для лизиса эукариотических клеток добавляли 100 мкл 1% Triton X-100. Через 15 секунд в лунки вносили 900 мкл PBS и тщательно ресуспендировали образец. Делали серию десятикратных разведений с последующими высевами на питательную среду.

**Адгезия подвижных и неподвижных листерий к клеткам HEp-2.** 18-часовые культуры листерий, выращенные в сердечно-мозговом бульоне (ВН) при температуре  $25^\circ\text{C}$  или  $37^\circ\text{C}$ , разводили в свежей среде ВН в соотношении 1:9 и инкубировали до достижения оптической плотности ( $OD_{600}$ ), равной 2, что соответствует концентрации бактерий  $10^9$  кл/мл.

Для оценки эффективности адгезии подвижных бактерий с активированным повышением температуры *prf* регулоном ночную культуру *L. monocytogenes EGDe*

получали при температуре 25<sup>0</sup>С. Затем ее разбавляли свежим ВНИ в соотношении 1:9 и инкубировали при той же температуре в течение 5 часов. После этого полученную бактериальную суспензию разделяли на два образца, один из которых инкубировали в тех же условиях, в то время как другой - при 37<sup>0</sup>С в течение 2ч, после чего оценивали адгезию к клеткам, как описано выше.

**Инвазия *L. monocytogenes* в клетки HEp-2.** Эффективность инвазии *L. monocytogenes* в клетки HEp-2 исследовали с использованием гентамицинового теста. По достижению в 24-луночном планшете 70% монослоя клеток HEp-2 в каждую лунку вносили 1 мл бактериальной суспензии в концентрации 10<sup>9</sup> кл/мл, через 15 и 60 минут инкубации суспензию удаляли, а лунки тщательно промывали стерильным раствором PBS трижды. Затем в лунки вносили 1 мл питательной среды, содержащей гентамицин в концентрации 100мкг/мл, и инкубировали 60 мин для достижения гибели внеклеточных листерий. После удаления антибиотика лунки трижды промывали стерильным PBS и вносили 100 мкл 1% Triton X-100 для лизиса эукариотических клеток. Через 15 секунд, когда клеточные мембраны лизировались, в каждую лунку добавляли 900 мкл PBS и тщательно ресуспендировали образец. После этого делали серию десятикратных разведений с последующими высевами на питательную среду. Подсчет колоний проводился через 24 ч инкубации при 37<sup>0</sup>С.

**Визуализация бактериальных и эукариотических клеток.** Для приготовления образцов адгезировавшихся на пластике бактерий в 24-луночный планшет помещали предварительно вырезанные фрагменты из пластика площадью 1см<sup>2</sup>. 1 мл бактериальной суспензии в концентрации 10<sup>9</sup> кл/мл вносили в каждую лунку и инкубировали 15 и 60 мин, после чего адгезировавшиеся бактерии отмывали трижды PBS и окрашивали красителем Hoechst 33342 (ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя.

Для визуализации бактерий на поверхности эукариотических клеток культуру HEp-2 выращивали на покровных стеклах до формирования 70% монослоя. Затем из лунок отбирали питательную среду и вносили по 1 мл бактериальной суспензии в концентрации 10<sup>9</sup> кл/мл на 15 мин и 60 мин. По истечении данного времени из каждого планшета удаляли жидкость, образцы трижды промывали стерильным PBS и фиксировали 3,7% нейтральным формальдегидом 10 минут. После удаления формальдегида образцы снова трижды промывали стерильным PBS, затем окрашивали Hoechst 33342.

Для дальнейшей визуализации бактерий, адгезировавшихся на клетках и пластике, использовали флуоресцентную микроскопию при увеличении в 1000 раз с помощью микроскопа Zeiss Axio Scope A1.

**Визуализация бактерий с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).** Для сканирующей электронной микроскопии культуры клеток с прикрепившимися бактериями промывали и фиксировали, как описано выше. СЭМ выполняли с использованием микроскопа Camscan S2 (Cambridge Scientific Instruments, Уитчфорд, Великобритания) в режиме визуализации вторичных электронов (SEI) с

оптическим разрешением 10 нм и рабочим напряжением 20 кВ. Изображения были получены с помощью программного обеспечения MicroCapture (СМА, Москва, Россия).

**Оценка антибиотикочувствительности.** Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* Pa21, *P. aeruginosa* 1840 и *L. monocytogenes* EGDe к гентамицину определяли с помощью диско-диффузионного метода и метода определения минимальных ингибирующих концентраций.

**Статистический анализ.** Все эксперименты проводили не менее, чем трижды. Значения среднего и стандартного отклонения (SD) рассчитывались на основе всего набора данных, где это применимо, в Excel, входящем в программное обеспечение Microsoft Office 2016. Статистический анализ проводился с использованием Т-теста, включенного в то же программное обеспечение, а также с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Допущение об однородности дисперсии проверялось с помощью теста Левена. Статистические различия считались значимыми, когда значение  $p$  составляло  $<0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Разработка и валидация прототипа системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий

Было протестировано более 20 вариантов конструкций микрофлюидической камеры и выбраны оптимальные параметры, позволяющие наблюдать характер движения бактерий на расстоянии 10-15 мкм как от дна канала, так и от стекла, чтобы исключить взаимодействие бактерий с поверхностью при помощи флагелл и иметь возможность наблюдать за траекториями движения на стадии выхода бактерии из толщи суспензии (так называемой стадии «landing»).

В результате подбора условий записи и анализа изображений подвижных частиц был создан рабочий прототип системы анализа паттернов приповерхностного движения, который позволил получить следующие характеристики движения: мгновенные и средние скорости, распределения скоростей по модулю и направлению; среднюю длину траектории движения и время пребывания в слое, на котором сфокусирован объектив микроскопа, а также временную зависимость среднеквадратичных смещений, что является показателем активности бактериальной среды в целом.

Следующим этапом работы была валидация прототипа при оценке характеристик движения бактерий в средах с разной вязкостью. Было установлено, что разработанный прототип позволяет достоверно детектировать изменения в подвижности листерий при незначительном повышении вязкости раствора на  $0,0516$  (с  $1,004$  до  $1,0556$ )  $\cdot 10^{-3}$  Па $\cdot$ с и при изменении концентрации бактерий с  $0,3 \cdot 10^9$  клеток/мл до  $1,7 \cdot 10^9$  клеток/мл.

Таким образом, разрабатываемый прототип системы анализа паттернов подвижности позволяла достоверно детектировать изменения в скорости движения на уровне долей микрометра (от 0,3 до 0,9) по средним скоростям.

### 3.2. Анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*

Изучение характеристик и траекторий движения патогенных и сапрофитических бактерий было проведено на моделях энтерогемморагической *E. coli* ATCC43890, и пробиотического штамма *E. coli* M17, входящего в состав препарата «колибактерин». В качестве отрицательного контроля использовался малоподвижный лабораторный штамм JM109.

Бактериологический тест на подвижность в полужидком агаре не выявил различий между подвижными штаммами M17 и ATCC43890 (рис. 1). Оба штамма распространялись в полужидком агаре с одинаковой эффективностью, которая была заметно выше, чем у контрольного неподвижного штамма JM109.

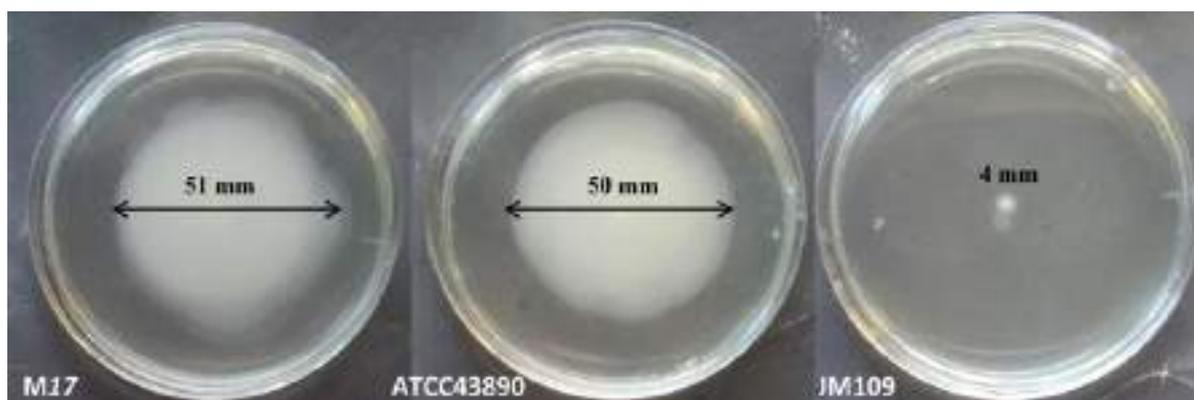


Рисунок 1. Подвижность штаммов *E. coli* в полужидком агаре.

Однако характеристики приповерхностного движения, полученные с использованием разработанной системы анализа паттернов подвижности, показывали наличие различий между пробиотическим и патогенным штаммами *E. coli*. В то время как в PBS средние значения скорости были одинаковыми для всех трех штаммов, другие характеристики значительно различались (табл. 1). Было установлено, что ATCC439890 продемонстрировал самое короткое время пребывания в слое по сравнению с JM109 и M17 (0,9, 3,5 и 3,0 секунды для ATCC43890, JM109 и M17 соответственно). Эти данные, по-видимому, свидетельствовали о том, что ATCC439890 переходил из слоя в слой, перемещаясь в вертикальном направлении чаще, чем другие штаммы.

Таблица 1. Характеристики перемещения штаммов *E. coli*.

Параметры	JM109	M17	ATCC43890
Средняя скорость, мкм/с	5,7±0,5	6,2±0,5	5,5±0,5
Время пребывания в слое, с	3,5±0,3	3±0,3	0,9±0,3
Среднее расстояние, мкм	~2,6±0,3	~7±0,7	~1,4±0,1
Максимальное пройденное расстояние, мкм	10±1	30±3	3-5±0,5

Полярная гистограмма, показывающая направления движения, усредненные по всем кадрам, показывает, что для JM109 направленное движение отсутствовало (рис. 2, д), что характерно для типичных броуновских частиц. Подвижный штамм M17 имел самые высокие значения среднего и максимального расстояний, пройденных одной бактерией, которые составляли 7 мкм и 30 мкм соответственно. Кроме того, бактерии M17 продемонстрировали направленное движение, что также отражено на полярной гистограмме (рис. 2, д). ATCC43890 имел самую короткую среднюю траекторию 1,7 мкм и максимальное расстояние всего 5 мкм. Эти значения были в 1,5 и 2 раза меньше, чем для JM109 с броуновским движением, и в 4 и 6 раз меньше, чем для M17, соответственно. В то же время траектории ATCC43890 не имели выраженного коллективного или индивидуального направленного движения и были похожи на траектории JM109 (рис. 2, д).

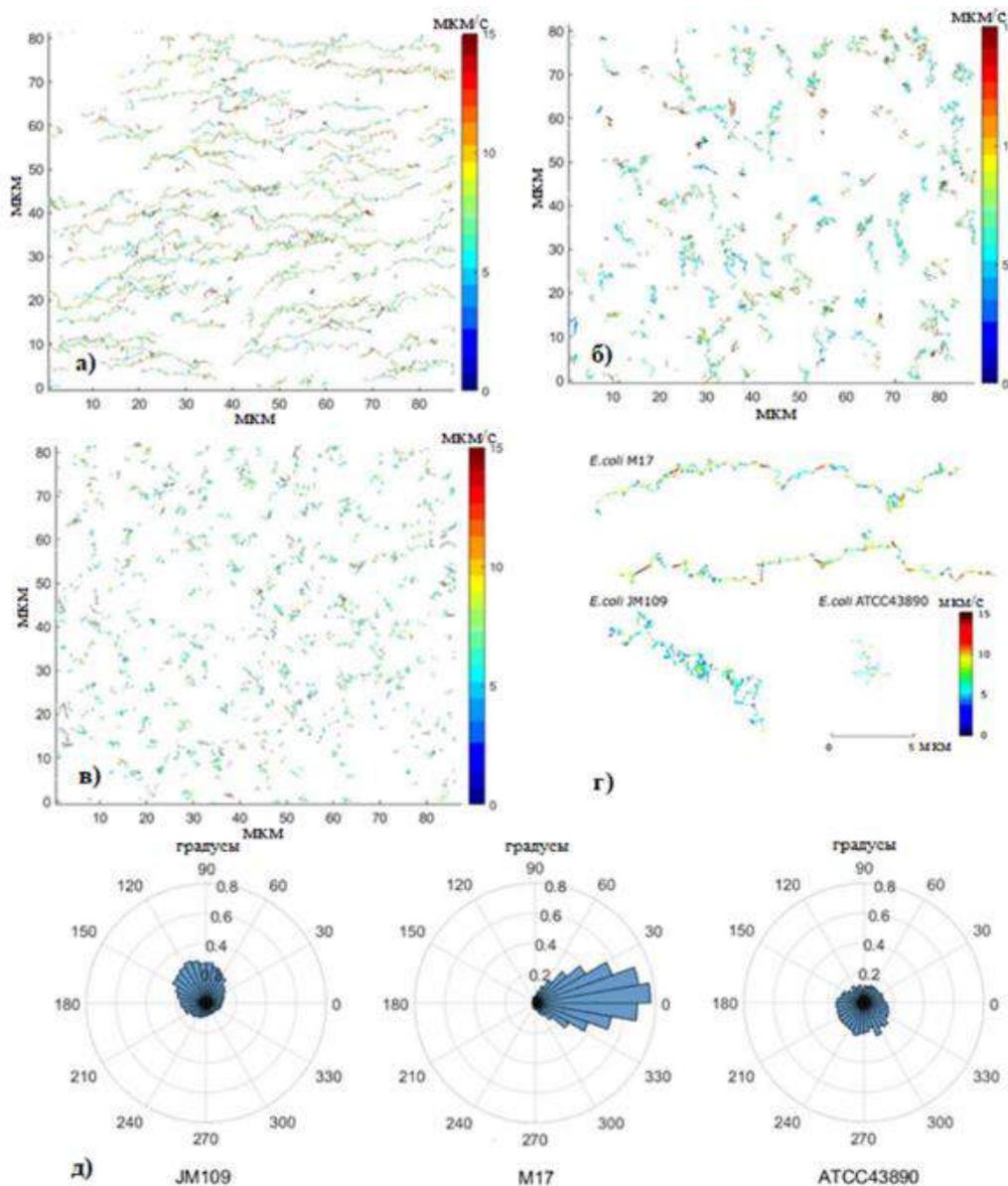


Рисунок 2. Восстановленные траектории, закодированные цветом в соответствии со значениями мгновенных скоростей, для разных штаммов *E. coli*: (а) M17 (б) JM109 (в) ATCC43890. (г) Типичная траектория для каждого штамма. (д) Угловые распределения векторов мгновенной скорости для каждого штамма.

Полученные данные по характеристикам приповерхностного движения позволили предположить наличие различий в характере адгезии к абиотическим и биотическим поверхностям

### 3.3. Характеристика эффективности адгезии к пластику подвижных и неподвижных штаммов *E. coli*

Мы сравнили эффективность адгезии бактерий к горизонтальным поверхностям для трех изученных штаммов. Эффективность адгезии к абиотической поверхности была оценена в 24-луночном планшете из полиэтилентерефталата. Через 15 мин малоподвижный JM109 показал самую низкую эффективность адгезии ( $0,14 \pm 0,04\%$  от первоначально добавленных бактерий), но увеличение экспозиции до 60 мин повысило эффективность его адгезии в  $6,3 \pm 2,1$  раза. Подвижные штаммы продемонстрировали более эффективную быструю адгезию  $2,71 \pm 0,2\%$  и  $0,32 \pm 0,07\%$  для M17 и ATCC43890, соответственно, через 15 минут. Однако динамика адгезии подвижных штаммов была совершенно иной по сравнению с JM109. После 60-минутной инкубации абсолютное количество прикрепленных бактерий M17 просто удвоилось и достигло  $5,12 \pm 0,56\%$  от первоначально добавленных. Для ATCC43890 увеличение времени инкубации до 30 мин привело к трехкратному уменьшению числа прикрепленных клеток с  $0,32\%$  до  $0,1\%$  ( $p < 0,05$ ), а 60-минутная инкубация привела к повышению эффективности адгезии на  $0,52\%$ , что было самым низким показателем для трех штаммов и в 1,7 раза ниже, чем для малоподвижного штамма JM109 (рис. 3).

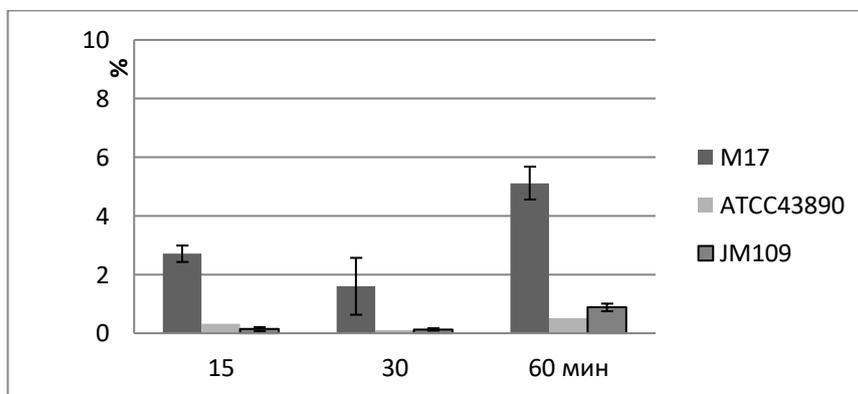


Рисунок 3. Скорость адгезии к пластику различных штаммов *E. coli*.

Таким образом, адгезия, по-видимому, являлась динамическим процессом для подвижных бактерий и результатом пассивного оседания в случае со слабоподвижным штаммом.

### 3.4. Оценка влияния подвижности *E. coli* на эффективность адгезии к клеткам человека линии HEp-2

Как M17, так и ATCC43890 могут колонизировать кишечник, поскольку первый является пробиотическим, а второй - патогенным. Чтобы проанализировать, влияют ли наблюдаемые различия в характере подвижности на бактериальные взаимодействия с эпителиальными клетками, мы использовали линию HEp-2. Эти клетки имеют рецепторы ламинина и фибронектина, которые являются специфическими мишенями для геморрагического штамма *E. coli* ATCC43890 (Williams et al., 2014). Через 15 минут

инкубации для JM109 и M17 эффективность адгезии была сопоставима с адгезией на пластике ( $0,27 \pm 0,11\%$  и  $5,79 \pm 1,56\%$  для JM109 и M17 соответственно). Однако эффективность адгезии ATCC 43890 к клеткам HEp-2 была ниже, чем к пластику ( $0,13 \pm 0,03\%$  и  $0,32 \pm 0,07\%$  для HEp-2 и пластику через 15 минут после добавления бактерий, соответственно). Инкубация в течение 60 минут привела к увеличению количества адгезировавшихся бактерий JM109 в 9,2 раза по сравнению с первыми 15 минутами. Напротив, длительная 60-минутная инкубация почти не увеличивала количество адгезировавшихся бактерий M17 и ATCC43890 (увеличение в 1,07 и 1,5 раза соответственно), (рис. 4).

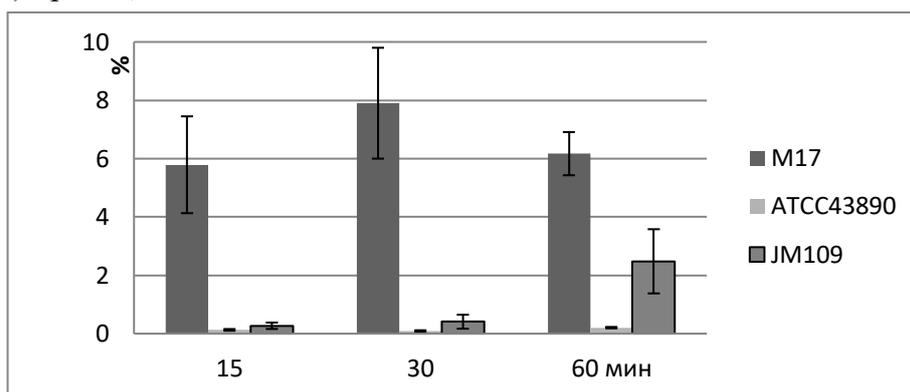


Рисунок 4. Скорость адгезии к клеткам HEp-2 у различных штаммов *E. coli*

Полученные результаты позволили предположить, что повышение эффективности адгезии неподвижного штамма *E. coli* JM109 после 60 минут инкубации было в основном обусловлено осаждением бактерий под действием силы тяжести. Отсутствие положительной динамики для подвижных штаммов может свидетельствовать о том, что процент бактерий, способных к адгезии на эукариотических клетках, ограничен. Другим объяснением может быть ограниченная доступность рецепторов, в результате чего за 15 мин инкубации доступные к взаимодействию рецепторы были преимущественно заняты. Разница в динамике адгезии к пластику и к клеткам HEp-2 подтверждает второе предположение: в то время как количество бактерий M17 и ATCC43890, адгезировавшихся к пластику, увеличилось с 15 до 60 минут, при взаимодействии с клетками HEp-2 этого не наблюдалось.

### 3.5. Анализ рисунков адгезии патогенных и сапрофитных штаммов *E. coli*.

Для того чтобы понять, с чем связаны разные уровни адгезии, сравнивали рисунки адгезии на пластике и на клетках для разных штаммов.

Малоподвижный JM109 прикреплялся к пластику и поверхности клеток HEp-2 в виде небольших автоагрегатов, что предполагало начальную флокуляцию и соответствует нашему предположению о его пассивном осаждении (рис. 5, а, г). Для M17 было характерно неравномерное распределение по пластику с формированием линейных кластеров из 3–5 или более бактериальных клеток (рис. 5, б). При взаимодействии с клетками HEp-2 бактерии M17 концентрировались преимущественно на границе между соседними клетками, формируя группы из более чем 10 бактерий с той же линейной геометрией, что и на поверхности пластика (рис. 5, д). Напротив, ATCC43890 имели совершенно другой

рисунок адгезии. На пластике они располагались одиночно или формировали группы из двух бактерий, а на поверхности эукариотических клеток обнаруживались равномерно расположенные изолированные бактерии и не наблюдалось никакого тропизма к областям контакта соседних клеток (рис. 5, в).

Второй большой задачей было установление характеристик подвижности разных видов листерий, патогенных и непатогенных, и вклада подвижности в способность к адгезии и инвазии в эукариотические клетки. В целом методы и подходы, используемые на этом этапе работы, не отличались от используемых ранее.

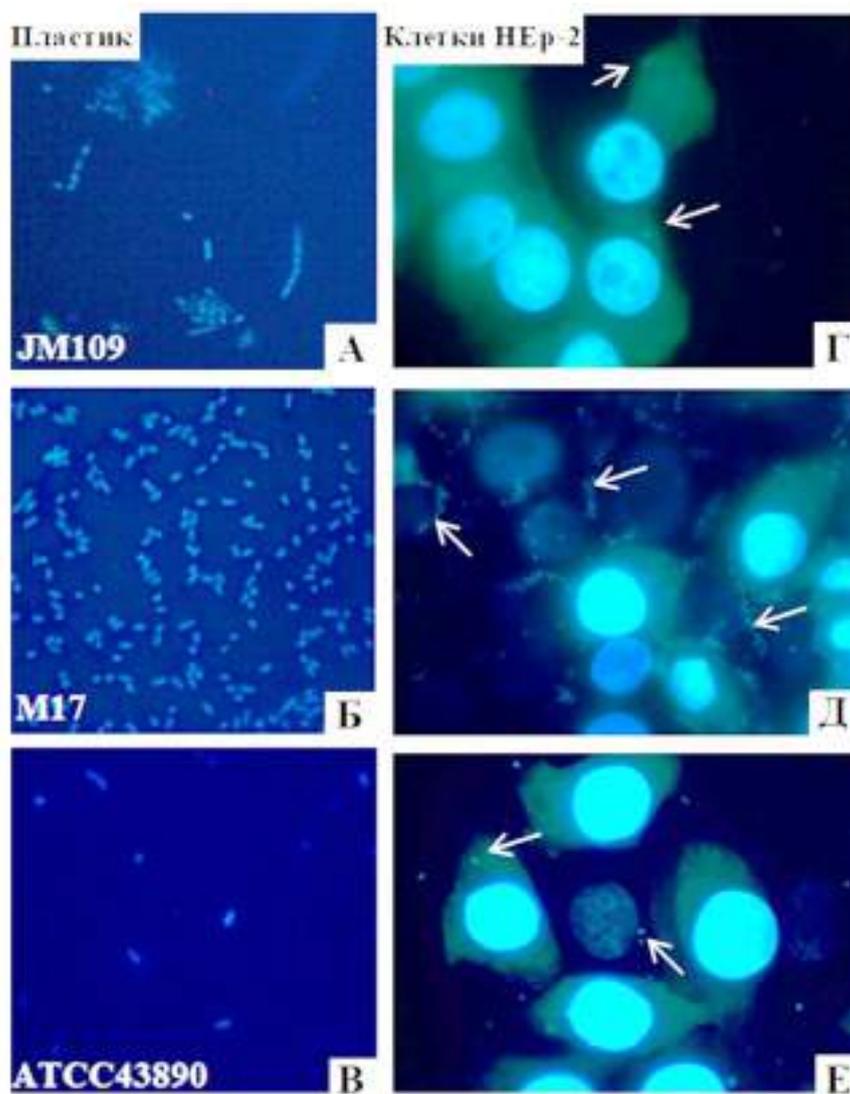


Рисунок 5. Микрофотографии адгезировавшихся штаммов кишечной палочки. Стрелками показаны адгезировавшиеся бактерии в определенных зонах поверхности клеток.

### 3.6. Анализ паттернов приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *Listeria spp.*

Мы проанализировали паттерны приповерхностного движения патогенных и сапрофитических видов листерий: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* и *L. seeligeri*. В качестве контроля использовали неподвижных *L. monocytogenes*, которых инкубировали при 37°C (рис.6).

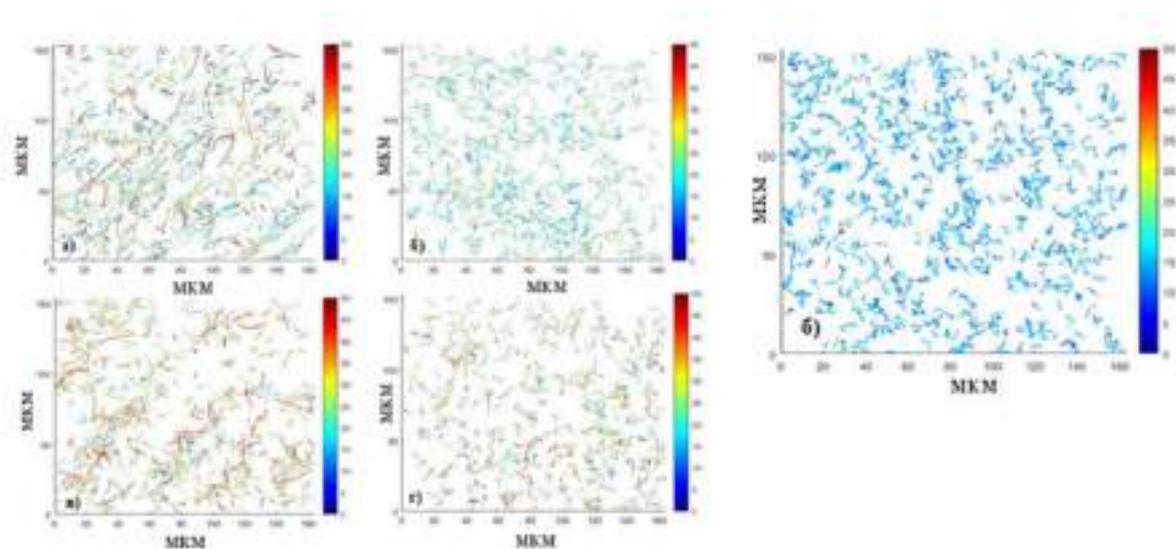


Рисунок 6. Восстановленные траектории, закодированные цветом в соответствии со значениями мгновенных скоростей, для разных видов листерии: (а) *L. monocytogenes*, (б) *L. innocua*, (в) *L. ivanovii*, (г) *L. seeligery*, (д) неподвижный контроль (*L. monocytogenes*, 37°C).

Патогенные и условно патогенные виды листерий имели одинаковые характеристики и траектории движения в физиологических условиях. В PBS средние значения скорости были близкими для всех видов листерии (20, 17, 27, 25 мкм/с для *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* и *L. seeligery*, соответственно). Однако *L. monocytogenes* при температуре инкубации 37°C продемонстрировали типичное броуновское движение со средним расстоянием, пройденным одной бактерией в пределах горизонтального слоя жидкости, равным 6,4 мкм (рис.6д, табл. 2.). При 25°C *L. monocytogenes* имели самые высокие значения средних расстояний, пройденных одной бактерией - 10 мкм.

Таблица 2. Характеристики подвижности листерий разных видов

Параметры	<i>L. m</i> 37°C	<i>L. m</i> 25°C	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligery</i>
Средняя скорость	~12 мкм/с	20 мкм/с	17 мкм/с	~27 мкм/с	~25 мкм/с
Среднее время пребывания в слое	2,3 с	0,8 с	0,9 с	0,6 с	0,7 с
Среднее расстояние	6,4 мкм	10 мкм	7,8 мкм	9 мкм	8,4 мкм

### 3.7. Анализ профилей скоростей *L. monocytogenes* и *L. innocua* на стадии приповерхностного движения.

Затем мы сравнили характер подвижности двух видов *Listeria*: патогенного вида *L. monocytogenes*, штамма EGDe и сапрофитического вида *L. innocua*, штамма SLCC 3379.

Распределение профилей скоростей подвижных бактерий носило нормальный (гауссовский) характер (*L. innocua*) или было близко к нормальному распределению (*L. monocytogenes*) (рис. 7А). Профиль скорости неподвижных *L. monocytogenes* отклонялся от нормального распределения за счет заметного преобладания бактерий со скоростями от 0 до 7 мкм/с, что соответствует отсутствию активной подвижности. Распределение

мгновенных направлений скорости было симметричным для неподвижных *L. monocytogenes* и асимметричным для подвижных бактерий (рис. 7Б). Такая асимметрия предполагает скоординированную подвижность отдельных клеток (Ishikawa et al., 2007). Для дальнейшей характеристики подвижности бактерий и подтверждения предположения о преобладании направленного типа подвижности над хаотичной составляющей мы рассчитали зависимость среднеквадратического смещения (СКО) от времени ( $t$ ). Для суспензии неподвижных *L. monocytogenes* была обнаружена типичная для классической броуновской динамики линейная зависимость MSD от времени. Для подвижных *L. monocytogenes* и *L. innocua* смещение MSD было пропорционально затраченному времени в степени 1,5 ( $\sim t^{1,5}$ ), что указывает на активное движение в горизонтальной плоскости (данные приведены в тексте диссертации).

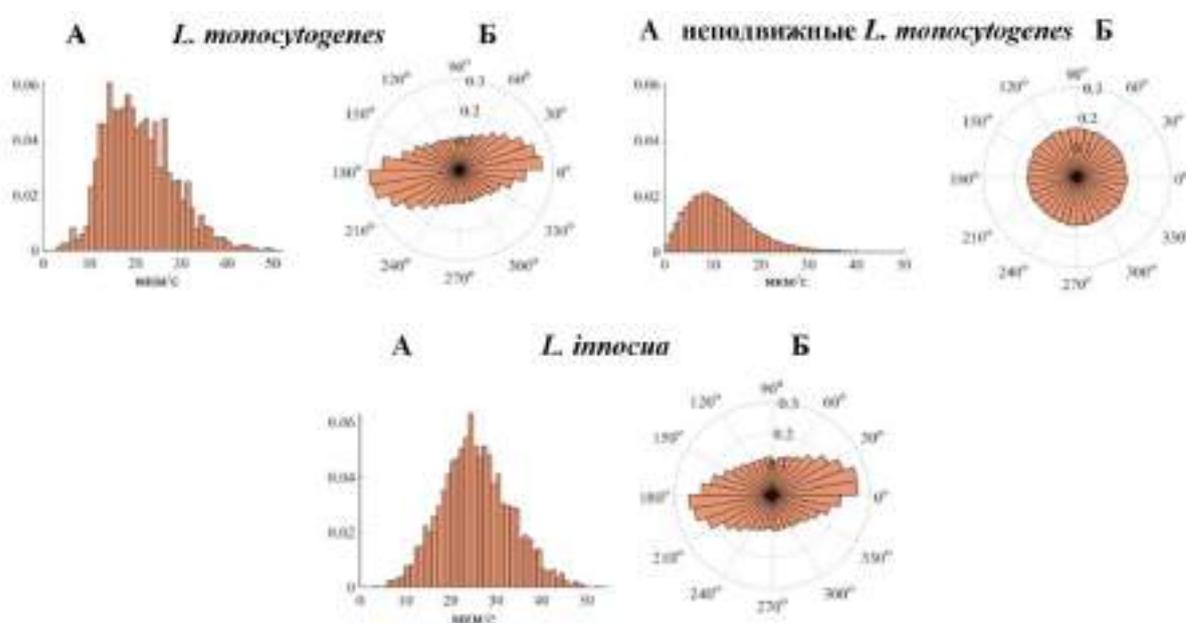


Рисунок 7. Распределение мгновенных скоростей (А) по модулю и (Б) направлению.

В совокупности полученные результаты показали, что патогенные и сапрофитные виды *Listeria spp* демонстрировали сходные паттерны подвижности, которые отличались от паттернов, демонстрируемых контрольной культурой неподвижных *L. monocytogenes*.

### 3.8. Оценка эффективности адгезии подвижных *Listeria spp*.

Характер адгезии подвижных патогенных и сапрофитных видов *Listeria* был очень схожим через 15 и 60 минут, что позволяет предположить, что характер адгезии, обусловленный подвижностью, не зависит от вирулентности (рис. 8). Неподвижные бактерии часто образовывали небольшие агрегаты, включающие до 10 клеток. Короткое время наблюдения не позволяли клеткам делиться, поэтому эти группы могли возникнуть скорее в результате седиментации флоккул, образовавшихся в объеме жидкости. Принимая во внимание все вышеизложенное, можно предположить, что подвижность препятствовала флокуляции бактерий в объеме жидкости.

Для количественной оценки эффективности адгезии были рассчитаны коэффициенты адгезии, то есть отношение бактерий, адгезировавших на пластиковой поверхности, к

бактериям, добавленным в лунку (рис. 8, Г). Было установлено, что подвижные виды *Listeria* продемонстрировали сходные закономерности адгезии, особенно на ранних стадиях наблюдения, тогда как эффективность адгезии была индивидуальной.

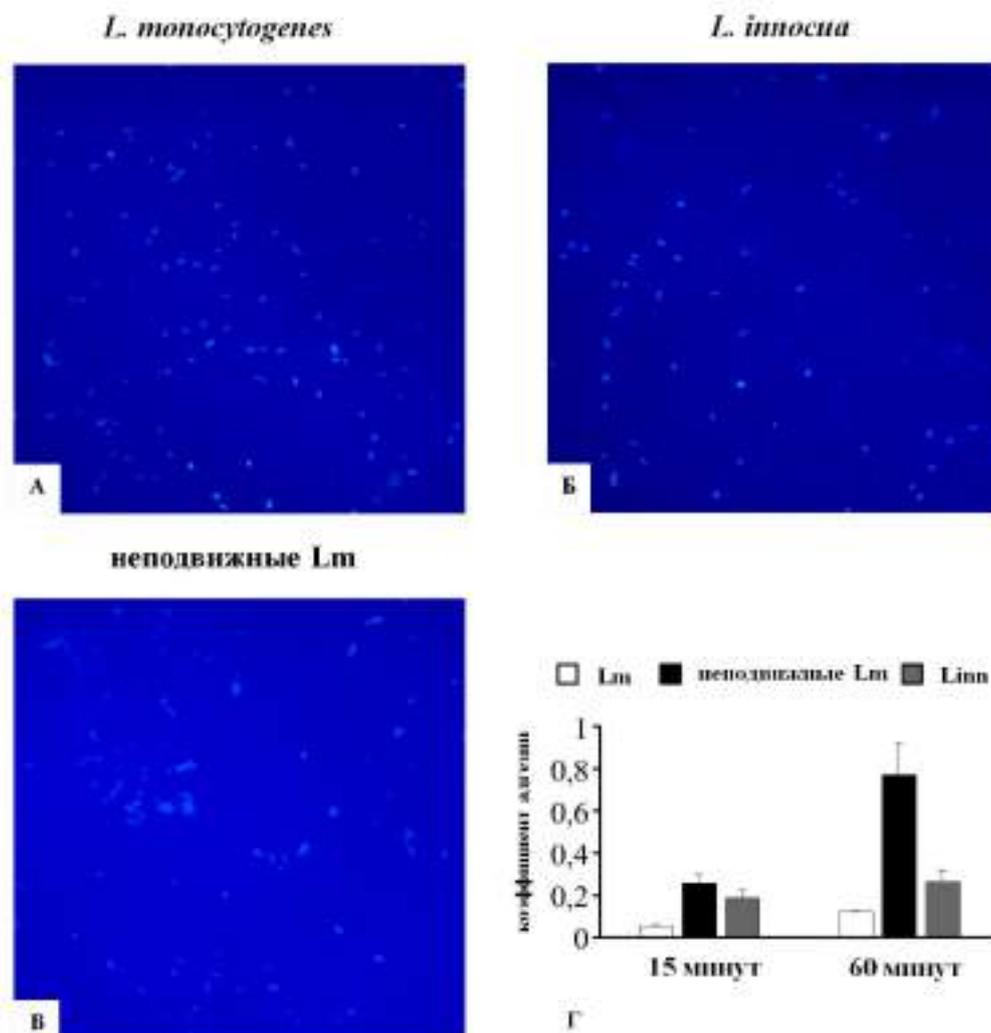


Рисунок 8. Адгезия к поверхности пластика. Иллюстрация типичных рисунков бактериальной адгезии (А) *L. monocytogenes*, (Б) *L. innocua* и (В) неподвижного *L. monocytogenes*, соответственно. (Г) – эффективность адгезии.

### 3.9. Распределение подвижных и неподвижных бактерий *Listeria spp.* на поверхности клеток HEp-2.

Неподвижные *L. monocytogenes* были распределены случайным образом по поверхности слоя клеток HEp-2, включая область над ядрами (рис. 9). Наблюдались бесформенные агрегаты, аналогичные агрегатам на поверхности пластика, что позволяет предположить такое же гравитационно-стимулированное осаждение флоккул, образованных неподвижными бактериями в объеме жидкости. Напротив, как подвижные *L. monocytogenes*, так и *L. innocua* преимущественно располагались на периферии клетки. Разница в количестве *L. monocytogenes* и *L. innocua*, прикрепившихся к поверхности клеток, была менее выражена, чем в случае с адгезией на пластик (рис. 9Б). Чтобы

подтвердить визуальное впечатление о неравномерном распределении бактерий, рассчитывали распределение бактерий относительно ядра клетки. Количественные данные подтвердили предположение о неравномерном распределении бактерий. В частности, часть неподвижных бактерий располагалась над ядром или непосредственно рядом с ядром (рис. 9В). Число подвижных бактерий в непосредственной близости от ядра было незначительным. Процент бактерий на периферии клетки был выше у подвижных бактерий по сравнению с неподвижными.

Сканирующая электронная микроскопия подтвердила предположение об относительно равномерном распределении неподвижных бактерий, которые часто были представлены небольшими флоккулами на поверхности клетки, включая области над ядром. Подвижные бактерии как патогенных, так и сапрофитических видов были менее многочисленными, а их распределение было неравномерным: они скапливались на периферии клеток в области межклеточных границ.

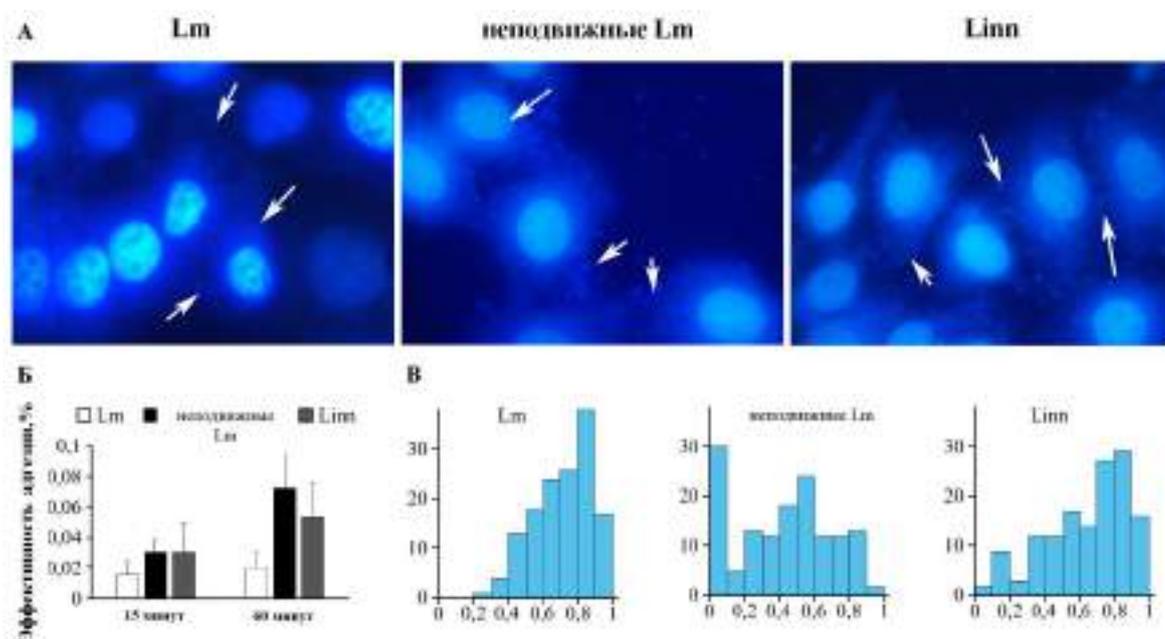


Рисунок 9. Адгезия к поверхности эпителиальных клеток HEp-2. (А) – характер адгезии *L. monocytogenes*, неподвижного *L. monocytogenes* и *L. innocua* к клеткам HEp-2 через 60 минут инкубации; белые стрелки указывают положение бактериальных клеток.

(Б) – эффективность адгезии выражается в процентах прикрепившихся бактерий к количеству добавленных бактерий. (В) - распределение бактерий относительно клеточного ядра

### 3.10. Оценка инвазии подвижных и неподвижных *L. monocytogenes*

Для *L. monocytogenes* как факультативного внутриклеточного паразита важно, чтобы адгезия приводила к инвазии. Через 15 минут инкубации эффективность инвазии неподвижных и подвижных *L. monocytogenes* была низкой и достоверно не различалась ( $2,0 \times 10^{-5}\%$  и  $5,9 \times 10^{-5}\%$  соответственно; рис. 10, А). Однако после 60-минутной инкубации инвазия неподвижных бактерий была почти в 10 раз эффективнее, чем подвижных ( $0,001\%$  и  $0,0001\%$  соответственно;  $p < 0,01$ ).

Низкая эффективность инвазии подвижных *L. monocytogenes* может быть обусловлена репрессией регулона вирулентности у бактерий, выращенных при температуре окружающей среды. Для увеличения экспрессии факторов инвазии InlA и InlB, необходимых для проникновения листерий в эпителиальные клетки, изменяли температуру инкубации подвижной культуры *L. monocytogenes* с 25 на 37°C на два часа, после чего использовали эту бактериальную культуру для оценки инвазии. Усиление экспрессии факторов инвазии в культуре, инкубированной при температуре 37°C, контролировали по продукции InlB на поверхности бактерий. Перевод подвижной культуры *L. monocytogenes*, выращенной при 22°C, на 2 ч на 37°C привел к появлению на поверхности листерий InlB в количестве, сравнимом с неподвижным *L. monocytogenes*, выращенным при 37°C в течение ночи (рис.10, Б). Культуру, выращенную в течение ночи при температуре окружающей среды и перенесенную на 2 ч на 37°C, обозначили как *L. monocytogenes*\*.

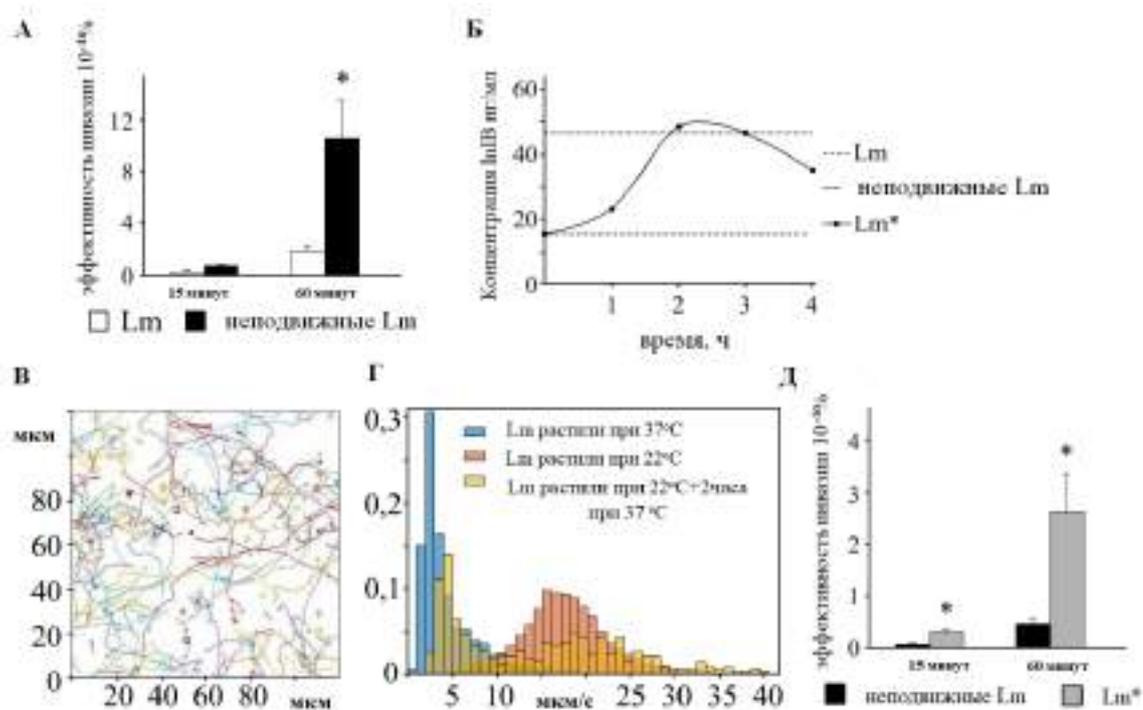


Рисунок 10. Эффективность инвазии *L. monocytogenes* в клетки HEp-2 в зависимости от подвижности и продукции InlB. (А) эффективность инвазии подвижных и неподвижных *L. monocytogenes*. (Б) – Уровни продукции InlB. (В) индивидуальные траектории бактерий *L. monocytogenes*\*, выращенных при 22°C и переведенных на 37°C на 2 ч; (Г) распределение индивидуальных скоростей для подвижных *L. monocytogenes* (розовые столбцы; рост при 22°C), неподвижных *L. monocytogenes* (синие столбцы, рост при 37°C) и *L. monocytogenes*\* (желтые столбцы; рост при 22°C с последующим переносом на 37°C), (Д) - эффективность инвазии *L. monocytogenes*\* и неподвижных *L. monocytogenes*.

После 15-минутной адгезии инвазия подвижных *L. monocytogenes*\* была, как минимум, в восемь раз более эффективной, чем инвазия неподвижного *L. monocytogenes*

( $p < 0,01$ ; рис. 10, Д). После 60-минутной адгезии эффективность инвазии подвижных *L. monocytogenes*\* и неподвижных *L. monocytogenes* различалась в 2,5 раза ( $p < 0,01$ ), несмотря на гораздо большее количество неподвижных бактерий, прикрепившихся к поверхности клетки (см. рис. 10, Б).

Таким образом, подвижность заметно улучшала инвазию *in vitro* бактерий, экспрессирующих факторы инвазии.

### 3.11. Применение разработанной системы для экспресс-оценки антибиотикочувствительности на примере *L. monocytogenes*

Завершающим этапом работы стала оценка возможности использования разработанной системы анализа движения бактерий для экспресс-диагностики чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. В пилотных исследованиях мы использовали модель *L. monocytogenes* и антибиотик гентамицин, являющийся «золотым стандартом» в лечении листериоза.

Для тестирования разработанной системы анализа паттернов приповерхностного движения инкубировали *L. monocytogenes* EGDe в среде, содержащей 100 мкг/мл гентамицина (10 МИК) 30,60 и 90 мин (рис. 11).

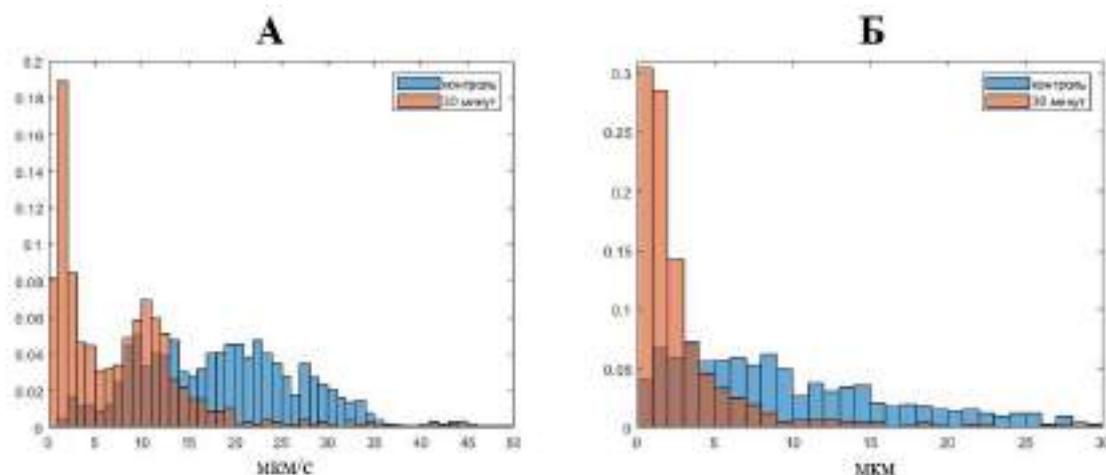


Рисунок 11. А - Распределение скоростей движения в интактном образце (контроль) и через 30 минут инкубации в растворе гентамицина, Б - Распределение длин траекторий в интактном образце (контроль) и через 30 мин. инкубации в растворе гентамицина

Уже через 30 минут инкубации мы смогли детектировать снижение средней скорости движения микроорганизмов в растворе антибиотика с 20 до 10 мкм/с и смещение средней длины траектории с 12 до 3 мкм.

### 3.12. Применение разработанной системы для экспресс-оценки антибиотикочувствительности на примере чувствительных и устойчивых к гентамицину штаммов *P. aeruginosa*

В работе использовали два штамма (клинические изоляты) *P. aeruginosa*, штамм 1840 (чувствительный) и штамм Pa21 (устойчивый).

Анализ полученных данных показал, что распределение скоростей для чувствительного штамма *P. aeruginosa* 1840, инкубированного в течение 90 минут с

гентамицином (10 МИК, 1000 мкг/мл), достоверно отличался от распределения скоростей в культуре того же штамма, инкубированного в течение того же времени при тех же условиях без гентамицина (рис. 12). Для оценки достоверности различий использовали тест Колмогорова-Смирнова (рис. 13).

Таким образом, чувствительные к гентамицину бактерии *P. aeruginosa* 1840 достоверно изменили характеристики подвижности (распределение мгновенных скоростей) через 90 минут инкубации с гентамицином. При этом устойчивые к гентамицину бактерии *P. aeruginosa* 21 не изменили характеристики подвижности в аналогичных условиях инкубирования.

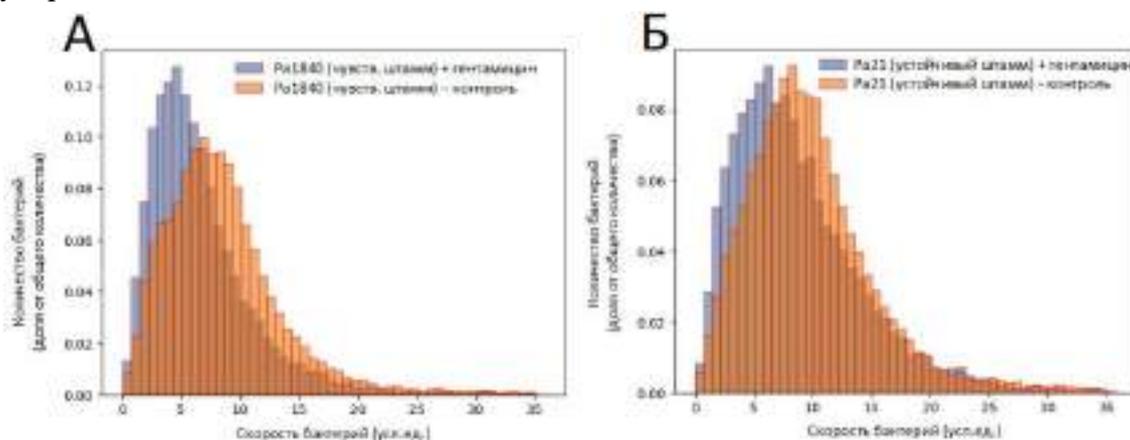


Рисунок 12. Различия в подвижности чувствительного (*P. aeruginosa* 1840) и устойчивого (*P. aeruginosa* Pa21) к гентамицину штаммов.

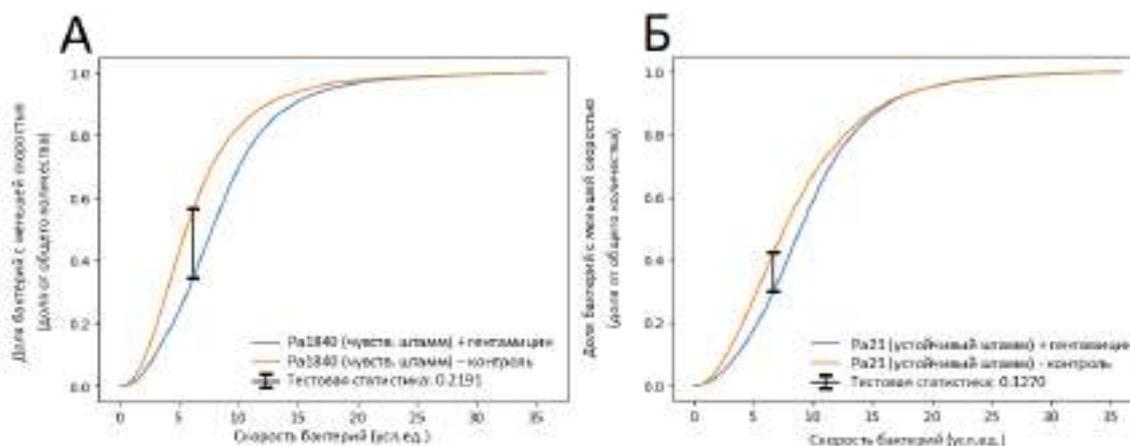


Рисунок 13. Тест Колмогорова-Смирнова для чувствительного (*P. aeruginosa* 1840) и устойчивого (*P. aeruginosa* Pa21) к гентамицину штаммов.

## ВЫВОДЫ

1. Создана система анализа паттернов приповерхностного движения микроорганизмов с использованием 3D печати микрофлюидических камер и программной обработки микровидеосъемки помещенных в камеры бактерий.

2. Проведена валидация разработанной системы на подвижных патогенных бактериях *E. coli* и *L. monocytogenes*. Показано, что разработанная система обладает чувствительностью к изменению средних скоростей бактерий в диапазоне 0,3-0,5 мкм/с и

детектирует изменения траекторий микроорганизмов при изменении параметров вязкости и концентрации подвижных частиц.

3. Впервые выявлены различия в паттернах подвижности штаммов *E. coli*: энтерогеморрагического штамма ATCC43890 и пробиотического штамма M17. Показано, что коллективное движение сапрофитического штамма M17 параллельно поверхности коррелировало с формированием скоплений бактерий в местах межклеточных контактов. Движение энтеропатогенного штамма ATCC43890 преимущественно в вертикальной плоскости приводило к равномерному распределению возбудителя на поверхности клеток, что может быть связано с более успешным поиском рецепторов для взаимодействия с эукариотической клеткой и реализации патогенных свойств

4. Впервые установлено, что все виды используемых в работе листерий (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) имели сходные паттерны приповерхностного движения, аналогичные паттернам штамма *E. coli* M17, что приводило к образованию скоплений бактерий в местах межклеточных контактов и увеличивало эффективность инвазии штамма EGDe патогенного вида *L. monocytogenes* в клетки человека Нер-2 в 8 раз по сравнению с неподвижной культурой того же штамма.

5. Установлено, что система анализа паттернов приповерхностного движения бактерий может быть использована для прогнозирования уровня антибиотикочувствительности: она позволяла детектировать изменения в жизнеспособности чувствительных и устойчивых к гентамицину *L. monocytogenes* и *P. aeruginosa* через 30 и 90 минут инкубации, соответственно, что выражалось в уменьшении средней скорости движения, средней длины траекторий и в изменении распределения мгновенных скоростей.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи:

1. Сысолятина Е.В. Особенности формирования активных сред бактериями *Listeria monocytogenes* в зависимости от температуры культивирования и вязкости раствора / Сысолятина Е.В., Абдулкадиева М.М., Мишина А.Е. [и др.] // Вестник Объединенного института высоких температур. – 2019. – Т. 2, № 1. – С. 75-78.

2. **Abdulkadieva M. M.** Strain specific motility patterns and surface adhesion of virulent and probiotic *Escherichia coli* / Abdulkadieva M. M., Sysolyatina E.V., Vasilieva E.V. [и др.] // Scientific Reports. – 2022. – Т. 12, № 1. – С. 614.

3. **Abdulkadieva M. M.** Motility provides specific adhesion patterns and improves *Listeria monocytogenes* invasion into human HEp-2 cells / Abdulkadieva M. M., Sysolyatina E.V., Vasilieva E.V. [и др.] // Plos one. – 2023. – Т. 18, № 8. – С. e0290842

### Тезисы докладов и материалы конференций

4. Васильева Е. В. Подвижность бактериальных активных сред. Особенности формирования активных сред в зависимости от характеристик среды и концентрации активных агентов на примере *Escherichia coli* / Васильева Е. В., Абдулкадиева М. М., Сысолятина Е.В. [и др.] // Биотехнология: взгляд в будущее. – Ставрополь: Ставропольский государственный медицинский университет, 2022. – С. 168-169.

5. **Абдулкадиева М.М.** Особенности поведения бактерий *Listeria monocytogenes* при формировании ими активных сред / Абдулкадиева М.М., Мишина А.Е. // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020»: электронный журнал. – URL: [https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2020/data/section\\_2\\_19228.htm](https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2020/data/section_2_19228.htm). – Дата публикации: 2020.
6. **Абдулкадиева М. М.** Паттерны приповерхностного движения и адгезия вирулентных и сапрофитических *E. coli*. / Абдулкадиева М. М., Сысолятина Е.В., Васильева Е. В. [и др.] // 3-й Российский Микробиологический Конгресс. – Псков: Псковский государственный университет, 2021. – С. 105. – ISBN 978-5-6046553-7-5
7. **Abdulkadieva M.M.** Virulent and probiotic *Escherichia coli* strains have different motility patterns and surface adhesion. / Abdulkadieva M.M., Sysolyatina E.V., Vasilieva E.V. [и др.] // FEMS Conference on Microbiology: электронный журнал. – URL: <https://acrobat.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:8d1278c7-8f23-3e24-9ac9-8164b981a9b9&viewer!megaVerb=group-discover>. – Дата публикации: 2022.
8. **Абдулкадиева М.М.** Связь характеристик подвижности *L. monocytogenes* с инвазией в клетки Нер-2. Relationship of *L. monocytogenes* motility characteristics with invasion into HEp-2 cells. / Абдулкадиева М.М., Литвиненко В.В., Васильева Е.В. [и др.] // X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. – Новосибирск: АНО «Инновационный центр Кольцово», 2023. – С. 302-304. – ISBN 978-5-4437-1526-1
9. **Абдулкадиева М.М.** Роль подвижности *Listeria monocytogenes* в инвазии в клетки HEp-2. / Абдулкадиева М.М., Литвиненко В.В. // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2023»: электронный журнал. – URL: [https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2023/data/section\\_5\\_28359.htm](https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2023/data/section_5_28359.htm). – Дата публикации: 2023.
10. **Абдулкадиева М.М.** Разработка системы быстрой детекции антибиотикорезистентности, основанная на *in situ* анализе бактериальной подвижности / Абдулкадиева М.М., Сысолятина Е.В., Васильева Е.В. [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2023. – Т. 25, № S1. – С. 9. – ISSN 1684-4386.
11. **Абдулкадиева М.М.** Связь характеристик подвижности *L. monocytogenes* с эффективностью адгезии и инвазии в клетки HEp-2. / Абдулкадиева М.М., Литвиненко В.В., Сысолятина Е.В. [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2024. – Т. 13, № 1. – С. 394-396. – ISSN 2522-137X