

Способность медленно- и быстрорастущих штаммов бактерий рода *Mycobacterium* взаимодействовать с чужеродной внеклеточной ДНК

А.В.Ильинов^{1,2}, А.Г.Савицкая³, О.Е.Хохлова⁴, Ю.С.Винник¹, О.В.Теплякова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация;

²Частное учреждение здравоохранения «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Красноярск», Красноярск, Российская Федерация;

³ФГБУН ГНЦ Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Москва, Российская Федерация;

⁴ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация

Цель исследования. Изучить взаимодействие клеток медленно- и быстрорастущих штаммов микобактерий с чужеродной внеклеточной ДНК (вкДНК), оценить ее способность влиять на устойчивость клеток микобактерий к антимикробным препаратам.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы медленно- и быстрорастущих *Mycobacterium tuberculosis* var. БЦЖ Токио 172, *Mycobacterium intracellulare* 13950 и быстрорастущих микобактерий *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841. Клетки микобактерий в начале экспоненциальной фазы роста, инкубировали с ДНК лосося на бульонных средах в течение 24 ч, отмывали и окрашивали оставшуюся на клетках вкДНК красителями SYTOX Green (SG) и CV-AM. Количество вкДНК оценивали методом проточной цитофлуориметрии. У штамма с наибольшим количественным изменением вкДНК определяли устойчивость к антибиотикам, механизм действия которых не предусматривает прямого взаимодействия с ДНК (амикацин и кларитромицин).

Результаты. Количество вкДНК у медленно- и быстрорастущих *M. tuberculosis* var. БЦЖ Токио 172 и *M. intracellulare* 13950 после инкубации с ДНК лосося не изменилось, в то время как у быстрорастущего штамма *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 оно увеличилось в 2,5 раза. Последующая инкубация *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 с антибиотиками в присутствии ДНК лосося показала, что концентрация ДНК лосося 310 нг/мл способствует увеличению устойчивости к амикацину, но не кларитромицину. Увеличение устойчивости к кларитромицину было выявлено только при концентрации ДНК лосося 3100 нг/мл и 10 мкг/мл кларитромицина.

Заключение. Быстрорастущие штаммы микобактерий более активно взаимодействуют с чужеродной вкДНК на начальных этапах роста (формирования биопленок), что способствует увеличению лекарственной устойчивости, в то время как медленно- и быстрорастущие штаммы практически не взаимодействуют с чужеродной ДНК на начальных этапах роста, что может быть связано с присутствием собственной вкДНК в необходимом количестве для данного этапа роста.

Ключевые слова: медленно- и быстрорастущие микобактерии, взаимодействие микобактерий, амикацин, кларитромицин, внеклеточная ДНК, биопленки

Для цитирования: Ильинов А.В., Савицкая А.Г., Хохлова О.Е., Винник Ю.С., Теплякова О.В. Способность медленно- и быстрорастущих штаммов бактерий рода *Mycobacterium* взаимодействовать с чужеродной внеклеточной ДНК. Бактериология. 2025; 10(3): 56–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-56-61

The ability of slow-growing and fast-growing strains of *Mycobacterium* to interact with foreign extracellular DNA (eDNA)

A.V.Ilinov^{1,2}, A.G.Savitskaya³, O.E.Khokhlova⁴, Yu.S.Vinnik¹, O.V.Teplyakova^{1,2}

Для корреспонденции:

Ильинов Александр Владимирович, врач-хирург, Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Красноярск; старший преподаватель кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1
ORCID: 0000-0002-8247-1388

Статья поступила 10.04.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Aleksandr V. Ilinov, surgeon, Clinical Hospital "RZhD-Medicine" in Krasnoyarsk, senior lecturer of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

Address: 1 Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
ORCID: 0000-0002-8247-1388

The article was received 10.04.2025, accepted for publication 30.09.2025

¹V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Private Healthcare Institution «Clinical Hospital» of Russian Railways Medicine Krasnoyarsk, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov State Research Center of the Russian Federation Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

⁴State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation

Aim of the study. Study the possibility of foreign eDNA to interact with slow-growers and fast-growers mycobacteria, to estimate the effect of foreign eDNA (salmon DNA) on antibiotic resistance of mycobacteria of interest.

Materials and methods. Slow-growers mycobacteria *Mycobacterium tuberculosis* var. BCG Tokyo 172, *Mycobacterium intracellulare* 13950 and fast-growers mycobacteria *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841. Mycobacterial cells, at the beginning of the exponential growth phase, were incubated with salmon DNA for 24 hours, cells were washed and stained with dyes SYTOX Green (SG) and CV-AM. Amount of eDNA was determined by cytoflowmetry. The strain with the greatest shift quantity of eDNA was tested for resistance to amikacin and clarithromycin.

Results. The eDNA amount of slow growers (*M. tuberculosis* var. BCG Tokyo 172 and *M. intracellulare* 13950) did not change after incubation with salmon DNA, while the fast-growing strain *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 the amount of eDNA increased by 2.5 times. We revealed resistance of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 to amikacin in the presence of 310 ng/ml but not to clarithromycin. Clarithromycin resistance was detected only at 3100 ng/ml salmon DNA and 10 µg/ml clarithromycin.

Conclusion. Fast-growing mycobacterial strains interact more actively with foreign eDNA at the initial stages of growth (biofilm formation); eDNA promotes increased drug resistance. While slow-growing strains practically do not interact with foreign eDNA at the initial stages of growth, this may be due to the presence of their own eDNA in the required amount for the studied stage of growth.

Key words: mycobacterium, antibiotic resistance, bacterial, clarithromycin, extracellular DNA, biofilms

For citation: Ilinov A.V., Savitskaya A.G., Khokhlova O.E., [Vinnik Yu.S.], Teplyakova O.V. The ability of slow-growing and fast-growing strains of *Mycobacterium* to interact with foreign extracellular DNA (eDNA). Bacteriology. 2025; 10(3): 56–61. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-56-61

Образование биопленок дает бактериям преимущество в росте, повышая устойчивость к меняющимся и/или агрессивным условиям окружающей среды, в т.ч. к антибиотикам и действию иммунной системы, что позволяет микроорганизмам сохраняться длительное время в макроорганизме [1–6]. Все представители рода *Mycobacterium* способны формировать биопленки. Биопленки микобактерий могут быть пелликулярного типа (на границе жидкость–воздух) и классическими (на границе субстрат–жидкость). Вне зависимости от типа биопленки в составе матрикса микобактерий обнаруживают внеклеточную ДНК (вкДНК), белки, липиды и экзополисахариды. Интересно, что состав матрикса у представителей рода *Mycobacterium* в количественно-временном отношении различается. Например, вкДНК у медленнорастущих микобактерий появляется в значимых количествах на первых этапах формирования биопленки, в то время как у быстрорастущих представителей микобактерий вкДНК в значимых количествах обнаруживается только в зрелых биопленках [1, 2, 7]. Данное различие связано с тем, что у медленнорастущих микобактерий вкДНК участвует в формировании архитектуры биопленок уже с первых этапов роста, в то время как у быстрорастущих микобактерий на начальных этапах формирования биопленок большую роль играют гликопептидолипиды и миколовые кислоты [1, 7]. Бактерии способны использовать не только собственную вкДНК, но и вкДНК, которая появляется в результате распада иммунных клеток, что способствует формированию биопленки и повышению лекарственной устойчивости бактерий [2–4].

В данной работе мы определили исходное количество вкДНК у представителей медленнорастущих и быстрорастущих микобактерий в начале экспоненциальной фазы роста.

Затем определили количественные изменения вкДНК быстрорастущих и медленнорастущих микобактерий при добавлении чужеродной ДНК (ДНК лосося (лДНК)). У штамма, который показал наибольшее количественное изменение вкДНК, оценили влияние чужеродной ДНК на устойчивость клеток микобактерий к амикацину и кларитромицину. Обнаружено, что при внесении чужеродной ДНК наибольшие изменения количества вкДНК были у быстрорастущего представителя микобактерий *M. fortuitum*. Внесение лДНК в качестве чужеродной ДНК приводит к повышению лекарственной устойчивости.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и питательные среды

В работе использовались представители медленнорастущих штаммов *M. tuberculosis* var. БЦЖ Tokyo 172, *M. intracellulare* 13950 и быстрорастущих штаммов микобактерий *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841. Культивирование бактерий проводили как на жидких, так и на твердых питательных средах при температуре 37°C в аэробных условиях в течение 72 ч. В качестве жидких питательных сред использовался питательный бульон Middlebrook 7H9 (BD, Franklin Lakes, Нидерланды) с добавлением 0,2% (об./об.) глицерина, 0,05% (об./об.) Tween 80 (MP Biomedicals, США) и 10% OADC (ADC с добавлением 0,06% (об./об.) олеиновой кислоты) (агар 7H11-OADC). Также культивирование проводили на бульонной среде 7H9, обогащенной ADC (бульон 7H9-ADC) (5% бычьего сывороточного альбумина (Wako Pure Chemical Industries, Япония), 0,81% NaCl и 2% D-глюкозы).

Для роста на твердых средах использовали агар *Mycobacteria* 7H11 (BD, Franklin Lakes, Нидерланды) с добавлением 0,5% (об./об.) глицерина и добавлением в 10% OADC (обогащение ADC с добавлением 0,06% (об./об.) олеиновой кислоты) (агар 7H11-OADC).

Обнаружение вкДНК

Обнаружение вкДНК на поверхности жизнеспособных клеток проводилось с помощью красителей CV-AM (Calcein Violet-Acetoxymethyl ester), индикатора присутствия эстеразы, маркера жизнеспособных бактерий (рис. 1), и SYTOX Green (SG) (Life-Technologies Corporation, США) который не проникает через неповрежденную клеточную мембрану, т.е. окрашивает ДНК (вкДНК). Красители растворяли согласно инструкции производителя (1 мг CV-AM в 250 мкл диметилсульфоксида (ДМСО); SG разбавили из исходного раствора производителя (5 мМ) до конечной концентрации 50 мкМ также с помощью ДМСО. Красители хранили при температуре -20°C.

Бактериальную культуру ($OD_{600} = 0,01$) вносили в две пробирки Эппендорф по 1 мл, в одну из них был добавлен 1 мкл (2 Ед) DNase I (Sigma-Aldrich, США). Образцы инкубировали в течение 12 ч при 37°C на роторной мешалке (4 об./мин). По завершении в чистую пробирку Эппендорф вносили по 100 мкл бактериальной суспензии после инкубации с DNase I, затем по 5 мкл красителя CV-AM и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. По окончании инкубации добавляли 1 мкл красителя SG с дальнейшей инкубацией в течение 15 мин при комнатной температуре. Для удаления избыточного количества красителя образцы однократно промывали питательной средой 7H9-ADC. Образцы *M. tuberculosis* H37Rv дополнительно фиксировали 4%-м параформальдегидом в фосфатном буфере PBS (phosphate-buffered saline). Далее все образцы суспендировали в буфере, содержащем 150 мкМ NaCl и 0,05% Tween 80. Анализ флуоресценции окрашенных клеток проводился на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences Inc., США) при длинах волн возбуждения 488 нм (SG) и 405 нм (CV-AM).

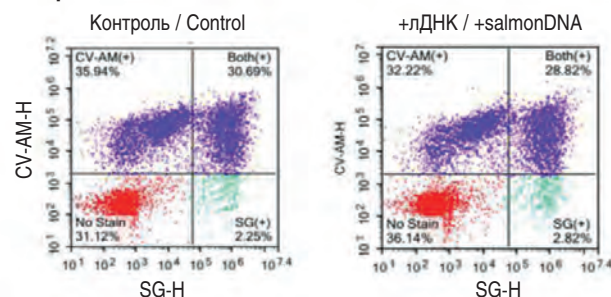
Инкубация с ДНК лосося

Микобактерии культивировали на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 при температуре 37°C до оптической плотности $OD_{600} = 0,01$. Полученную бактериальную культуру разделяли на 2 образца по 7 мл. В один из них добавляли лДНК эквивалентно рассчитанному количеству гДНК. Количество гДНК рассчитывали исходя из того, что 1 бактерия содержит 3,1 фг ($3,1 \cdot 10^{-15}$ г) ДНК, в бактериальной суспензии с оптической плотностью 1 может быть обнаружено 10^8 микобактерий/мл, таким образом, в 1 мл бактериальной суспензии с оптической плотностью 1 содержится 310 нг ДНК. Образцы инкубировали в течение 24 ч при 37°C с вращением на роторе при скорости 4 об./мин. Далее проводили обнаружение вкДНК на поверхности жизнеспособных клеток с помощью красителей CV-AM, как описано выше.

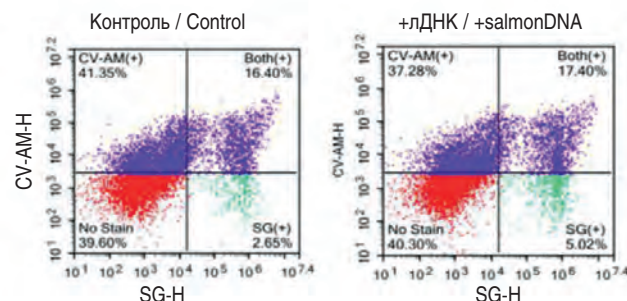
Устойчивость микобактерий к лекарственным препаратам

В работе использовали антибиотики амикацин и кларитромицин (Wako Pure Chemical Industries, Япония). Стоковые растворы антибиотиков стерилизовали фильтрованием

А БЦЖ / BCG



Б *M. intracellulare*



С *M. fortuitum*

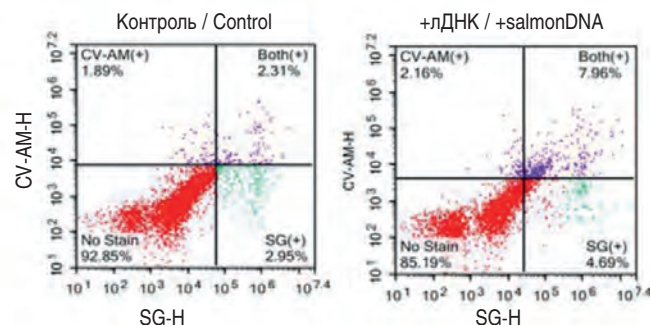


Рис. 1. Изменение количества вкДНК БЦЖ (А), *M. intracellulare* (Б) и *M. fortuitum* (С) в контроле (контроль) и после инкубации с чужеродной ДНК (+лДНК). Секция CV-AM показывает процент жизнеспособных клеток в популяции, секция SG – процент мертвых клеток в популяции, секция Both – процент клеток с двойным окрашиванием, т.е. жизнеспособных клеток, несущих вкДНК.

Fig. 1. Changes in the amount of BCG (A), *M. intracellulare* (B) and *M. fortuitum* (C) extracellular DNA in the control and after incubation with foreign DNA (+salmonDNA). The CV-AM section shows the percentage of viable cells in the population; the SG section shows the percentage of dead cells in the population. Both sections show the percentage of double-stained cells, i.e. viable cells carrying extracellular DNA.

через мембрану с размером пор 0,45 мкм. До момента использования растворы хранили при -20°C. Клетки микобактерий инкубировали в бульоне 7H9/ADC до оптической плотности $OD_{600} = 0,1$. Затем культуры были разбавлены до оптической плотности $OD_{600} = 0,001$ с помощью стерильной свежей питательной среды 7H9/ADC, после чего была добавлена DNase I в количестве 0,25 Ед/мл. Инкубация продолжалась еще в течение 72 ч при 37°C на качалке, образцы без DNase I были культивированы аналогично.

По завершении инкубации (с DNase I или без нее) бактериальную суспензию разбавляли свежей питательной средой 7H9/ADC до оптической плотности $OD_{600} = 0,001$. В подготовленные таким образом бактериальные суспензии добавлялись, бактериальные культуры оставляли инкубироваться при 37°C на качалке в течение 6 и 24 ч. Контрольные

образцы без лекарственных препаратов были подготовлены в тех же условиях.

По завершении инкубации жизнеспособность клеток определяли с помощью метода серийных разведений.

Сразу после окончания культивирования микобактерий в питательной среде с антибиотиками / противотуберкулезными препаратами бактериальные клетки однократно отмывали от питательной среды, содержащей лекарственные препараты, стерильной водой и центрифугировали при 3500 об./мин. Серийные разведения проводили согласно методическим указаниям «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.1890-04). Инокулированные агаровые среды (7H11-OADC) инкубировали при 37°C в течение 3 нед. Далее проводили учет выросших клеток.

Результаты исследования

Присутствие вкДНК у микобактерий и ее положительное влияние на способность формировать биопленки, что, в свою очередь, способствует увеличению лекарственной устойчивости микобактерий, показаны на примере как быстро-, так и медленно-растущих представителей рода [1, 2]. Бактерии способны использовать как собственную вкДНК, которая высвобождается в результате гибели бактериальных клеток, так и чужеродную. Например, при возникновении инфекционного процесса *M. tuberculosis* способен использовать вкДНК, которая высвобождается в результате гибели фагоцитов [3].

Несмотря на то, что вкДНК может быть обнаружена у всех представителей рода *Mycobacterium*, ее значение для процесса формирования биопленок может различаться. У быстро-растущих микобактерий на начальных этапах формирования биопленок более важными молекулами являются экзополисахариды, а вкДНК в больших количествах обнаруживается уже в зрелых биопленках. При формировании биопленок медленно-растущими бактериями вкДНК выполняет важные функции с начальных этапов [1, 2]. Интересно оценить, способствует ли добавление чужеродной ДНК адсорбции этой ДНК на поверхности бактериальных клеток и происходит ли повышение лекарственной устойчивости [3, 4].

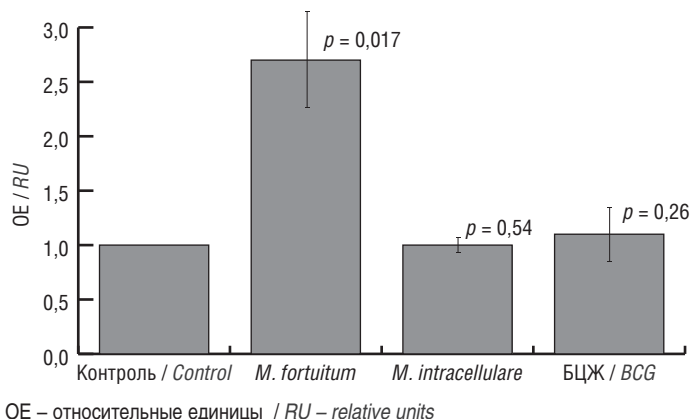


Рис. 2. Изменение количества вкДНК у микобактерий после инкубации с ДНК лосося.
 Fig. 2. Change in the amount of extracellular DNA in mycobacteria after incubation with salmon DNA.

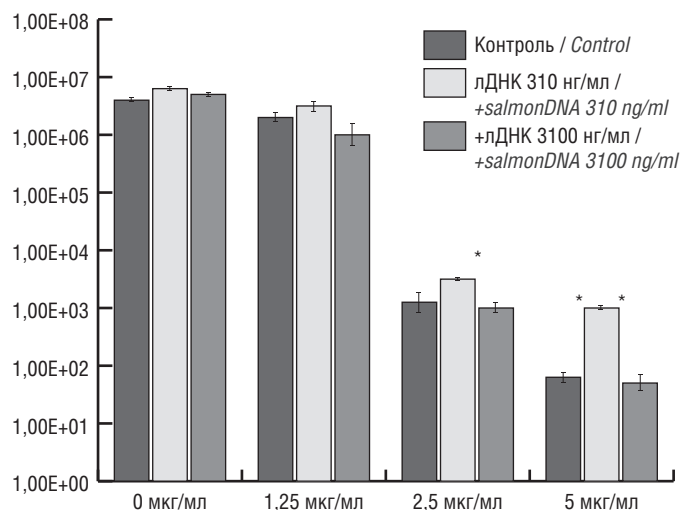


Рис. 3. Влияние ДНК лосося на устойчивость штамма *M. fortuitum* к амикацину, * $p < 0,05$.
 Fig. 3. Effect of salmon DNA on the resistance of *M. fortuitum* strain to amikacin, * $p < 0.05$.

Сначала мы определили базовый уровень вкДНК у медленно-растущих (*M. tuberculosis* var. БЦЖ, *M. intracellulare*) и быстро-растущих микобактерий (*M. fortuitum*). Бактерии культивировали на бульонной среде до экспоненциальной фазы роста, затем клетки окрашивали двумя красителями – SG и CV-AM. Определив исходное количество вкДНК у микобактерий, мы исследовали количественные колебания вкДНК микобактерий после инкубации с чужеродной ДНК (лДНК). Количественное определение вкДНК проводили методом проточной цитофлуометрии (рис. 1).

Изменение количества вкДНК у БЦЖ, *M. intracellulare* и *M. fortuitum* после инкубации с лДНК рассчитывали в относительных единицах (о.е.) относительно контроля, данные представлены на рис. 2.

Анализ результатов показал, что добавление чужеродной ДНК (лДНК) не привело к изменению количества вкДНК у штаммов БЦЖ и *M. intracellulare* по сравнению с контролем. В то же время инкубация быстро-растущего штамма *M. fortuitum* с лДНК привела к увеличению количества вкДНК в 2,5 раза по сравнению с контролем (рис. 2).

Поскольку увеличение количества вкДНК после инкубации с лДНК наблюдалось только у штамма *M. fortuitum*, дальнейшее исследование влияния лДНК на устойчивость к лекарственным препаратам проводилось на этом штамме. В качестве антимикробных агентов использовали амикацин и кларитромицин, механизм действия которых непосредственно не затрагивает ДНК. лДНК вносили в двух концентрациях, 310 и 3100 нг/мл, инкубировали с клетками *M. fortuitum*, затем клетки отмывали и вносили антибиотики в нескольких концентрациях на 24 ч, после чего клетки отмывали от остатков антибиотика и определяли КОЕ/мл.

Инкубация *M. fortuitum* с 1,25 мкг/мл амикацина в течение 24 ч не выявила различия с контролем при внесении лДНК в количестве 310 нг/мл, в то время как внесение лДНК в количестве 3100 нг/мл дало интересный результат – привело к снижению КОЕ/мл по сравнению с контролем. Увеличение концентрации амикацина до 2,5 мкг/мл выявило повышение

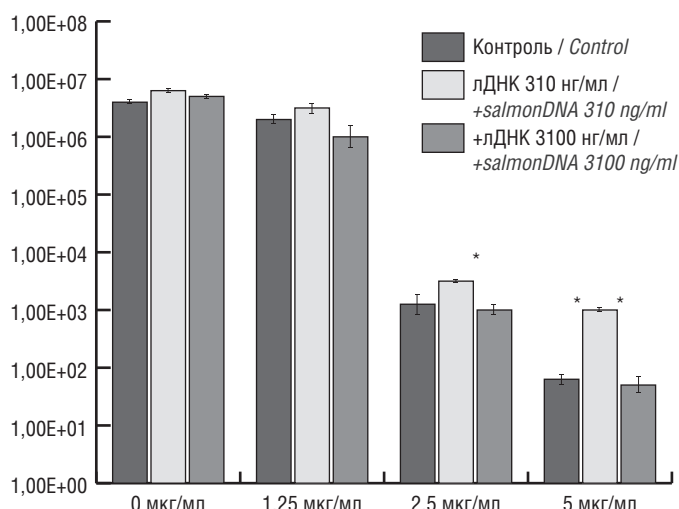


Рис. 4. Влияние ДНК лосося на устойчивость штамма *M. fortuitum* к кларитромицину.

Fig. 4. Effect of salmon DNA on clarithromycin resistance of *M. fortuitum* strain.

устойчивости в культуре, куда была внесена лДНК в количестве 310 нг/мл, относительно контроля, в то время как внесение лДНК в количестве 3100 нг/мл не привело к изменению КОЕ/мл, показатели были сопоставимы с контролем.

Таким образом, инкубация в среде с амикацином показала, что присутствие лДНК в количестве 310 нг/мл приводит к увеличению устойчивости бактерий к антибиотику, в то время как концентрация 3100 нг/мл не оказывает влияния на устойчивость *M. fortuitum* к амикацину относительно контроля (рис. 3).

Интересно, что 310 нг/мл лДНК оказывает положительный эффект на количество жизнеспособных клеток *M. fortuitum* при концентрации амикацина 2,5 и 5 мкг/мл, в то время как 3100 нг/мл лДНК не оказывает никакого эффекта.

Инкубация *M. fortuitum* с кларитромицином в концентрациях 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл привела к равному снижению КОЕ/мл в контроле и в присутствии лДНК в количестве 310 и 3100 нг/мл (рис. 4). При повышении концентрации кларитромицина до 10 мкг/мл наблюдалось увеличение количества жизнеспособных клеток только при добавлении 3100 нг/мл лДНК, в то время как КОЕ/мл при 310 нг/мл лДНК было сопоставимо с контролем.

Обсуждение

Отсутствие количественного увеличения вкДНК по сравнению с контролем у медленно растущих представителей микобактерий БЦЖ и *M. intracellulare* может быть связано с присутствием собственной вкДНК в необходимом для данной стадии роста количестве, конкурирующей с лДНК. Увеличение количества вкДНК у *M. fortuitum*, возможно, обусловлено изначально минимальным количеством микобактериальной вкДНК, что способствовало активному взаимодействию лДНК с поверхностью бактериальных клеток *M. fortuitum*.

Амикацин является полусинтетическим антибиотиком из группы аминогликозидов. Механизм его действия связан с

блокировкой синтеза белка. Амикацин связывается с 30S-субъединицей рибосом, блокирует образование комплекса транспортной и матричной РНК, вследствие чего нарушается синтез белка в клетке бактерий. Внесение лДНК в концентрации 310 нг/мл привело к увеличению устойчивости *M. fortuitum* к амикацину в концентрации 5 мкг/мл, в то время как внесение 3100 нг/мл лДНК не оказывало никакого эффекта по сравнению с контролем. Возможно, добавление лДНК в концентрации 3100 нг/мл является избытком для бактериальных клеток и не способствует формированию пелликулярных биопленок, напротив, их формирование ингибирует катионная природа лДНК, обволакивающей клетки микобактерий и препятствующей их взаимодействию.

Кларитромицин относится к группе макролидов, механизм действия которого обусловлен связыванием 23S РНК в месте туннеля выхода полипептида 50S рибосомальной субъединицы, что препятствует сборке рибосом, диссоциации тРНК и, как следствие, приводит к ингибированию белкового синтеза [8]. Внесение лДНК в количестве 310 нг/мл не оказало влияния на устойчивость *M. fortuitum* к антибиотику. Увеличение устойчивости наблюдалось только в одном случае – 3100 нг/мл лДНК при 10 мкг/мл кларитромицина. Отсутствие эффекта при других исследуемых концентрациях кларитромицина может быть связано с непосредственным влиянием антибиотика на молекулярные механизмы формирования биопленки. Способность кларитромицина ингибировать формирование биопленок была показана на примере *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* Typhimurium и *Staphylococcus aureus* [9–11]. Инкубация *S. Typhimurium* с кларитромицином в различных концентрациях выявила преобладающее влияние на дезинтеграцию биопленки (вплоть до концентрации антибиотика 1,56 мкМ), а не на жизнеспособность бактериальных клеток [11]. Возможно, кларитромицин способствует переходу клетки в состояние кислородного истощения и препятствует окислительному фосфорилированию, влияет на ферменты, участвующие в цепи переноса электронов бактерий, что также мешает формированию биопленки [9–11].

Еще одним объяснением отсутствия эффекта лДНК может быть заряд кларитромицина. Адсорбция кларитромицина может быть обусловлена электростатическим между зарядом поверхности бактериальной клетки и зарядом молекулы антибиотика. При значениях pH питательных сред, используемых в исследовании (~7,0), группа $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$ в молекуле кларитромицина заряжена положительно, в то время как клеточная стенка несет отрицательный заряд, что способствует взаимодействию между молекулой антибиотика и клеточной стенкой микобактерии [12].

Заключение

Мы показали, что внесение чужеродной ДНК лосося не привело к количественному изменению вкДНК у медленно растущих представителей микобактерий, использованных в данной работе. Тогда как быстрорастущие представители микобактерий имеют незначительное количество вкДНК на ранних этапах формирования биопленки: например, у *M. smegmatis* для начальной адгезии к поверхности во время

образования биопленки важны гликопептидолипиды и миколовые кислоты, а не вкДНК [13]. Однако мы показали, что внесение лДНК приводит к количественному увеличению вкДНК в 2,5 раза у *M. fortuitum*, представителя быстро-растущих микобактерий (рис. 1), что обусловлено изначально минимальным количеством микобактериальной вкДНК. Наличие свободных сайтов связывания облегчает взаимодействие лДНК с поверхностью бактериальных клеток *M. fortuitum*, более быстрому формированию биопленок и, как следствие, увеличению лекарственной устойчивости к амикацину. Таким образом, несмотря на то, что быстро-растущие микобактерии на начальных этапах формирования биопленок используют молекулы, отличные от вкДНК, внесение чужеродной ДНК ускоряет процесс формирования биопленок и способствует увеличению устойчивости к анти-микробным препаратам.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Rose SJ, Babrak LM, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* Possesses Extracellular DNA that Contributes to Biofilm Formation, Structural Integrity, and Tolerance to Antibiotics. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5):e0128772. DOI: 10.1371/journal.pone.0128772
- Vega-Dominguez P, Peterson E, Pan M, Di Maio A, Singh S, Umapathy S, et al. Biofilms of the non-tuberculous *Mycobacterium chelonae* form an extracellular matrix and display distinct expression patterns. *Cell Surf*. 2020 Aug 5;6:100043. DOI: 10.1016/j.tcsu.2020.100043
- Kirov SM, Webb JS, O'May CY, Reid DW, Woo JKK, Rice SA, et al. Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology (Reading)*. 2007 Oct;153(Pt 10):3264-3274. DOI: 10.1099/mic.0.2007/009092-0
- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog*. 2008 Nov;4(11):e1000213. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000213
- Parvin F, Hu H, Whiteley GS, Glasbey T, Vickery K. Difficulty in removing biofilm from dry surfaces. *J Hosp Infect*. 2019 Dec;103(4):465-467. DOI: 10.1016/j.jhin.2019.07.005
- Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, et al. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012 Feb;65(2):73-7. DOI: 10.1038/ja.2011.113
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002 Feb 22;295(5559):1487. DOI: 10.1126/science.295.5559.1487
- Zhang W, Li Z, Sun Y, Cui P, Liang J, Xing Q, et al. Cryo-EM structure of *Mycobacterium tuberculosis* 50S ribosomal subunit bound with clarithromycin reveals dynamic and specific interactions with macrolides. *Emerg Microbes Infect*. 2022 Dec;11(1):293-305. DOI: 10.1080/22221751.2021.2022439
- Bugli F, Palmieri V, Torelli R, Papi M, De Spirito M, Cacaci M, et al. *In vitro* effect of clarithromycin and alginate lyase against *Helicobacter pylori* biofilm. *Biotechnol Prog*. 2016 Nov;32(6):1584-1591. DOI: 10.1002/btpr.2339
- Zeng M, Li ZY, Ma J, Cao PP, Wang H, Cui YH, et al. Clarithromycin and dexamethasone show similar anti-inflammatory effects on distinct phenotypic chronic rhinosinusitis: an explant model study. *BMC Immunol*. 2015 Jun 6;16:37. DOI: 10.1186/s12865-015-0096-x
- Zafar M, Jahan H, Shafeeq S, Nimitz M, Jänsch L, Römmling U, et al. Clarithromycin Exerts an Antibiofilm Effect against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *rdar* Biofilm Formation and Transforms the Physiology towards an Apparent Oxygen-Depleted Energy and Carbon Metabolism. *Infect Immun*. 2020 Oct 19;88(11):e00510-20. DOI: 10.1128/IAI.00510-20
- Rodríguez-López L, Santás-Miguel V, Cela-Dablanca R, Núñez-Delgado A, Álvarez-Rodríguez E, Rodríguez-Seijo A, et al. Clarithromycin as soil and environmental pollutant: Adsorption-desorption processes and influence of pH. *Environ Res*. 2023 Sep 15;233:116520. DOI: 10.1016/j.envres.2023.116520
- Recht J, Kolter R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 2001 Oct;183(19):5718-24. DOI: 10.1128/JB.183.19.5718-5724.2001

Информация о соавторах:

Савицкая Анна Геннадьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник Государственного научного центра Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН
ORCID: 0000-0001-8519-020X

Хохлова Ольга Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; профессор факультета биологической безопасности «РОСБИОТЕХ» ПушчГЕНИ
ORCID: 0000-0002-2829-5117

Винник Юрий Семёнович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого
ORCID: 0000-0002-8995-2862

Теплякова Ольга Валериевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого; врач-хирург Клинической больницы «РЖД-Медицина» г. Красноярск
ORCID: 0000-0003-0005-3316

Information about co-authors:

Anna G. Savitskaya, PhD in Biological Sciences, Researcher, M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov State Research Center of the Russian Federation Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences
ORCID: 0000-0001-8519-020X

Olga E. Khokhlova, PhD, DSc (Biological Sciences), Associate Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs of the Department of Molecular Microbiology of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Professor of the Faculty of Biological Safety of the "ROSBIOTECH" PushchGENI
ORCID: 0000-0002-2829-5117

Yury S. Vinnik, Honored Scientist of the Russian Federation, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
ORCID: 0000-0002-8995-2862

Olga V. Teplyakova, MD, PhD, DSc, Professor of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Surgeon, Clinical Hospital "RZhD-Medicine" of the city of Krasnoyarsk
ORCID: 0000-0003-0005-3316