

УДК 577.15:579.61

## ДЕСТРУКЦИЯ БИОПЛЕНОК ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗОЙ РАРС ИЗ *ASPERGILLUS OCHRACEUS*

© 2024 г. Д. Р. Байдамшина<sup>a, \*</sup>, А. Рафия Наср<sup>a</sup>, С. К. Комаревцев<sup>b</sup>, А. А. Осмоловский<sup>c</sup>, К. А. Мирошников<sup>b, c</sup>, А. Р. Каюмов<sup>a</sup>, Е. Ю. Тризна<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

<sup>b</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия

<sup>c</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

\*e-mail: dianabaidamshina@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Инфекции, ассоциированные с образованием биопленок грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами, характеризуются различными сложностями в терапии и переходом в хронические формы. Поэтому требуется использование подходов, способствующих деструкции матрикса биопленок. В данной работе показано, что рекомбинантная сериновая протеаза РАРС из *Aspergillus ochraceus* при концентрации 50 мкг/мл обеспечивает деструкцию зрелых биопленок целого ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий на 15–20%, при концентрации 100 мкг/мл биомасса биопленок *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* снижается на 50%. Таким образом, протеаза РАРС может служить перспективным агентом для удаления биопленок и повышения эффективности противомикробной терапии.

**Ключевые слова:** протеолитические ферменты, бактериальные биопленки, устойчивость к противомикробным препаратам, разрушение биопленок

DOI: 10.31857/S0026365624020247

Одной из наиболее убедительных гипотез, объясняющих трудности лечения рецидивирующих инфекций, является способность бактерий образовывать в инфицированных тканях биопленки. В зависимости от вида, который формирует биопленку, они могут быть прикрепленными к поверхности или свободноплавающими многоклеточными агрегатами, заключенными во внеклеточный матрикс (Sauer et al., 2022). Структура, химический состав и физиология биопленки также зависят от природы обитающих в ней бактерий и окружающей среды. Однако важной общностью биопленок является зависимость структурной целостности от внеклеточного матрикса, продуцируемого клетками самой биопленки. Внеклеточный матрикс вносит значительный вклад в организацию сообщества и состоит из белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот в различном соотношении (Lahiri et al., 2021, Greer et al., 2021).

Формирование биопленок является фактором патогенности и толерантности бактерий к противомикробным препаратам (Usmani et al., 2021),

а также основной причиной инфекций, которые принято называть ассоциированными с образованием биопленок (biofilm-associated infections), таких как зубной кариес, периодонтит, средний отит, муковисцидоз, хронический синусит, хронические раневые инфекции, костно-мышечные инфекции, некротический фасциит, инфекции желчных путей, остеомиелит, бактериальный простатит, эндокардит, инфекции мочевыводящих путей. Внеклеточный матрикс биопленок способствует снижению или полной блокировке проникновения антибиотиков за счет диффузного барьера или способности макромолекул, входящих в состав матрикса, связывать антибиотики. Более того, измененная физиология бактериальных клеток в биопленках и ослабленная иммунная система организма-хозяина могут привести к трудностям в уничтожении биопленок (Melchior et al., 2006).

Использование ферментов для гидролиза матрикса биопленки (Khan et al., 2021), которое обеспечивает лучшее проникновение последующих используемых противомикробных агентов или

разрушает компоненты клеточной стенки патогенов, чтобы вызвать их лизис (Kaplan et al., 2018; Vuotto and Donelli, 2019), давно обсуждается в литературе. Разнообразные ферменты, такие как гликозидгидролазы, протеазы и ДНКазы способны повышать клеточную восприимчивость к противомикробным препаратам (Kaplan, 2010). Применение этих ферментов в комплексе с системными антибиотиками привело к значительным успехам в терапии бактериальных биопленок (Algburi et al., 2017).

Целью работы является оценка потенциала новой субтилизиновой протеазы РАРС из *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D для деструкции микробных биопленок.

В работе использовали штаммы *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Micrococcus luteus* (клинический изолят), *Enterococcus faecalis* (клинический изолят), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (клинический изолят). Клинические изоляты предоставлены Казанским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора Российской Федерации.

Культивирование бактерий проводили в питательной среде LB (Sambrook et al., 1989) состава (г/л): триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 5; рН 7.5. Для получения зрелых биопленок использовали питательную среду ВМ (Каутов et al., 2015) состава (г/л): пептон — 0.7, глюкоза — 0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0.2,  $CaCl_2$ —0.005.

РАРС является рекомбинантной фибринолитической протеазой-активатором протеина С плазмы крови из микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D (РАРС). Фермент был экспрессирован в *E. coli* BL21 (DE3), очищен металлохелатной хроматографией на смоле Ni-NTA, лиофилизирован и предоставлен для работы Мирошниковым К.А.

(Институт биоорганической химии РАН, Москва) (Komarevtsev et al., 2021).

Анализ образования биопленок проводили в 24-луночных пластиковых планшетах, как описано в работе (O'Toole, Kolter, 1998) с модификациями (Baidamshina et al., 2017). Бактерии выращивали 2 сут без качания при 37°C на среде ВМ (Basal Medium) в лунках с 1 мл культуры начальной плотностью  $3 \times 10^7$  КОЕ/мл. Через 48 ч культивирования из лунок опытного варианта удаляли культуральную жидкость и вносили среду с добавлением различных концентраций протеазы РАРС, после чего инкубировали в течение 24 ч. Затем из лунок удаляли культуральную жидкость, однократно промывали дистиллированной водой, просушивали при комнатной температуре в течение 20 мин, вносили 500 мкл 1% раствора кристаллического фиолетового ("Sigma-Aldrich", США) в 96% этаноле и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин с закрытой крышкой. Далее снова промывали дистиллированной водой, добавляли 96% этиловый спирт (500 мкл на лунку) и измеряли поглощение при длине волны 570 нм на микропланшетном ридере Infinite 200 Pro ("Tecan", Швейцария). В качестве контроля использовали чистые лунки, в которых проводились все манипуляции процесса окрашивания без внесения биоматериала.

Количественную оценку белкового компонента внеклеточного матрикса после ферментативной обработки проводили по поглощению Конго красного. Для этого из опытных лунок удаляли культуральную жидкость и вносили LB (Lysogeny broth), содержащий Конго красный ("Sigma-Aldrich", США; 40 мкг/мл). Затем механическим путем разрушали биопленку, как описано ранее (Baidamshina et al., 2017) и инкубировали 90 мин при 37°C, после

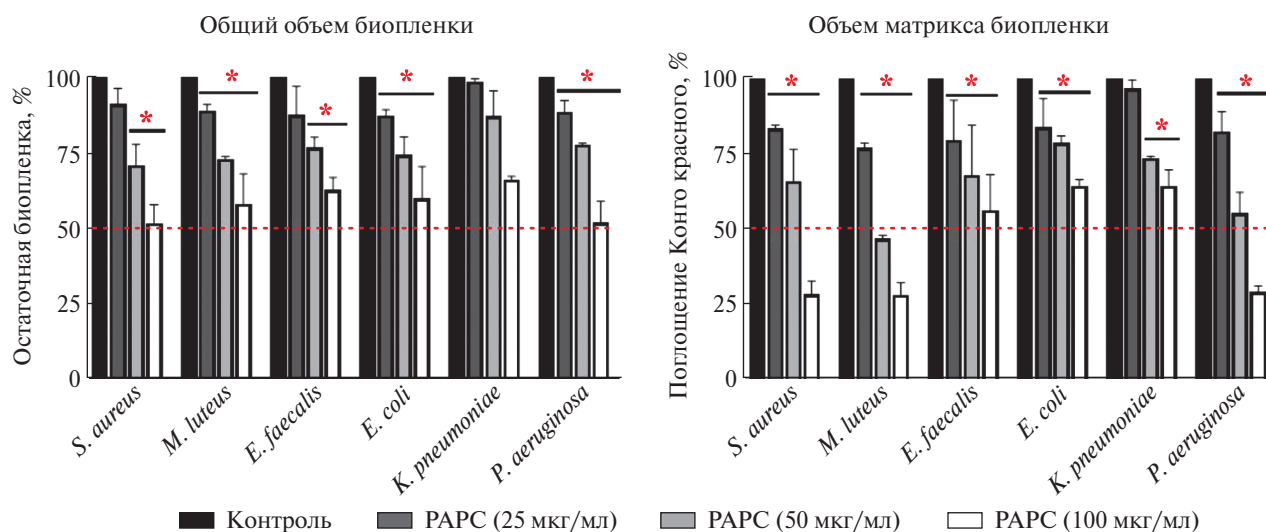


Рис. 1. Оценка разрушения общего объема биопленок и объема матрикса биопленок бактерий протеазой РАРС. Окраска кристаллическим фиолетовым и Конго красным.

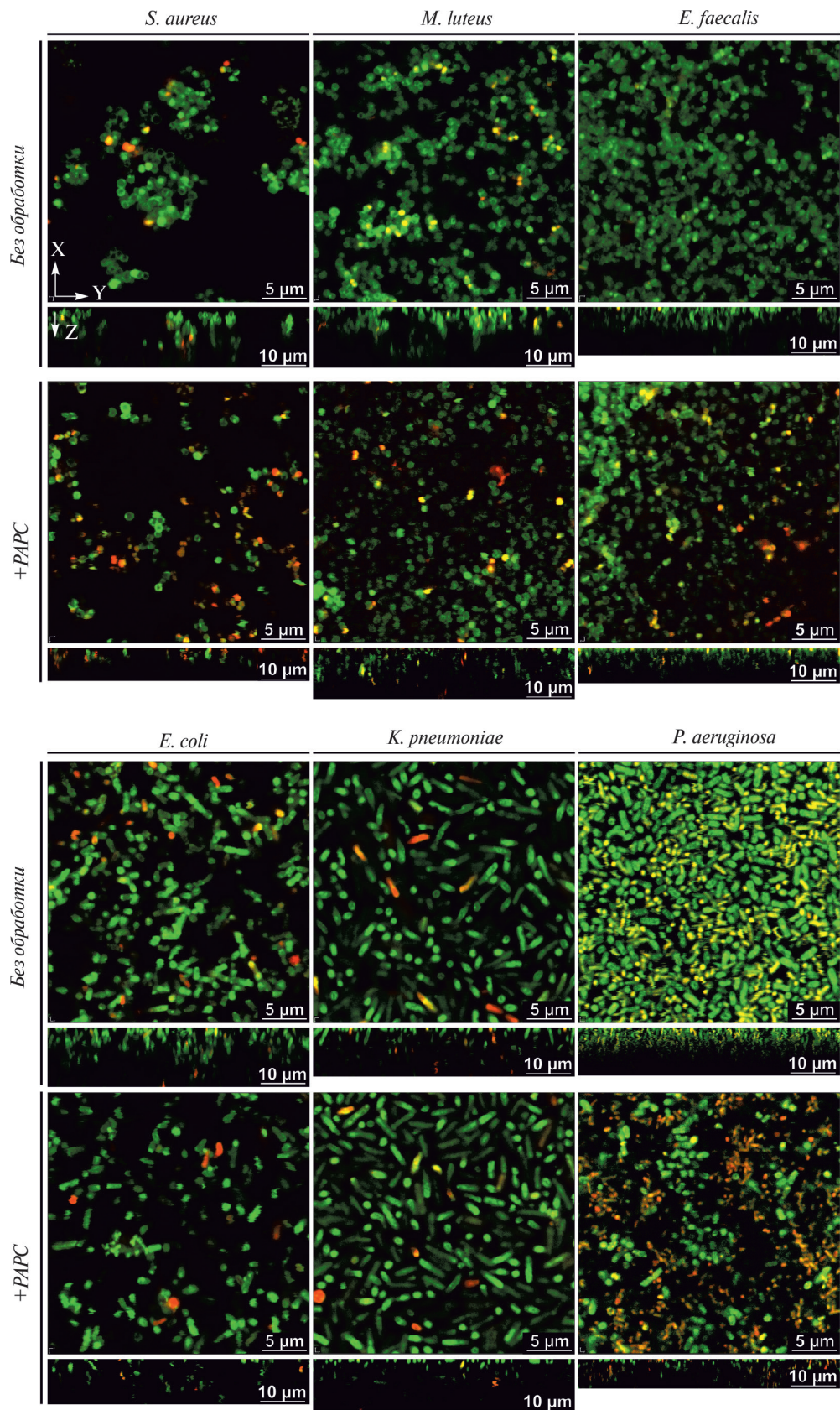


Рис. 2. Влияние RAPS (100 мкг/мл) на целостность биопленки и эффективность против клеток *S. aureus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* в составе сформированной биопленки. На микрофотографиях масштабная метка соответствует 5 мкм, на Z-срезах — 10 мкм.



чего центрифугировали планшет 20 мин при 3485 g. Переносили надосадочную жидкость в 96-луночные планшеты и измеряли концентрацию несвязавшегося красителя на микропланшетном ридере Infinite 200 Pro (“Tecan”, Швейцария) при длине волны 490 нм. В качестве контроля использовали исходный раствор красителя, который вносили в лунки, не содержащие биопленок. За показатель биомассы принимали разницу между поглощением в нативных биопленках и обработанных протеиназой РАРС.

Разрушение бактериальных биопленок оценивали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для этого бактерии выращивали в среде ВМ в 8-луночных адгезивных слайдах (“Ibidi”, Германия) в статических условиях. После 24 ч инкубации добавляли свежий бульон с добавлением фермента с конечной концентрацией 100 мкг/мл. После 24 ч инкубации биопленки окрашивали в течение 15 мин йодидом 3,3'-дигексильноксокарбоцианина (“Sigma-Aldrich”, США) в конечной концентрации 0.02 мкг/мл (зеленая флуоресценция) и пропидия йодидом (“Sigma-Aldrich”, США) в конечной концентрации 3 мкг/мл (красная флуоресценция) для дифференциации живых и нежизнеспособных клеток. Микроскопию выполняли с использованием инвертированного микроскопа Olympus IX83, дополненного платформой сверхширокого разрешения STEDYCON (Германия).

Формировали 48-часовые биопленки *S. aureus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* в 24-луночных планшетах при 37°C на среде ВМ, удаляли культуральную жидкость, вносили свежую среду и протеазу РАРС до конечных концентраций 25, 50, 100 мкг/мл, после чего продолжали инкубирование в течение 24 ч. Затем проводили окрашивание кристаллическим фиолетовым для оценки остаточной биопленки. В концентрации 50 мкг/мл протеаза РАРС разрушала биопленки всех тестируемых штаммов на 15–25%. Наиболее эффективно разрушались биопленки бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa*, при этом остаточная биопленка составила 50% после воздействия 100 мкг/мл РАРС (рис. 1).

Известно, что для существующих коммерческих ферментных препаратов для ранозаживления рекомендована концентрация свыше 1 мг/мл. Ранее было показано, что растительная протеаза Фицин способна гидролизовать биопленки золотистого стафилококка также при концентрации 1 мг/мл (Baidamshina et al., 2017). Таким образом, можно предположить, что более высокая протеолитическая активность исследуемого фермента будет способствовать более быстрому разрушению бактериальных биопленок, а, следовательно, с меньшей вероятностью проводить к побочным эффектам.

Большинство биопленок продуцируют внеклеточный матрикс, включающий белки в амилоидной форме, который способствует поддержанию

стабильности биопленки (Taglialegra et al., 2016). Чтобы проанализировать гидролиз амилоидов матрикса биопленки протеазой РАРС, мы проводили окрашивание нативных и обработанных ферментом биопленок Конго красным. После обработки протеазой РАРС содержание амилоидных компонентов матрикса биопленок всех шести штаммов было ниже, чем в необработанных пробах. Наибольшее снижение содержания амилоидов после обработки протеазой РАРС в концентрации 100 мкг/мл (остаточное содержание менее 30%) наблюдалось в биопленках бактерий *S. aureus*, *M. luteus* и *P. aeruginosa* (рис. 1).

Чтобы подтвердить способность протеазы РАРС разрушать зрелые биопленки грамположительных и грамотрицательных бактерий, проводили конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (рис. 2).

На микрофотографиях конфокальной микроскопии по оси Z (z-стеки) видно, что внесение протеазы РАРС приводит к снижению толщины слоя клеток, а значит и к снижению толщины биопленки всех исследуемых бактерий, при этом фермент не влияет на жизнеспособность бактерий в ее составе (Рис. 2). Тем не менее, наибольший эффект наблюдался в отношении биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa*, что подтверждает данные, полученные при окрашивании кристаллическим фиолетовым и Конго красным.

Таким образом, сериновая протеаза РАРС из микромицета *Aspergillus ochraceus* способна частично разрушать зрелые биопленки грамположительных и грамотрицательных бактерий, при этом максимальная концентрация фермента (100 мкг/мл) приводит к снижению общей биомассы биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa* до 50%. Показанные в ходе исследования данные являются теоретической основой для создания комплексных препаратов и принципов лечения для терапии наружных инфекций, ассоциированных с образованием биопленок.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FZSM-2022-0017).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Диана Рафисовна Байдамшина, Елена Юрьевна Тризна, Сергей Константинович Комаревцев, Ая Рафия Наср, Александр Андреевич Осмоловский — экспериментальные процедуры. Константин Анатольевич Мирошников, Айрат Рашитович Каюмов, Елена Юрьевна Тризна — руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Algburi A., Comito N., Kashtanov D., Dicks L.M., Chikindas M.L.* Control of biofilm formation: antibiotics and beyond // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 83. Art. e02508-16.
- Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Holyavka M.G., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Akhatova F.S., Rozhina E.V., Fakhrullin R.F., Kayumov A.R.* Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 46068.
- Greer H.M., Overton K., Ferguson M.A., Spain E.M., Darling L.E., Núñez M.E., Volle C.B.* Extracellular polymeric substance protects some cells in an *Escherichia coli* biofilm from the biomechanical consequences of treatment with magainin 2 // *Microorganisms.* 2021. V. 9. Art. 976.
- Kaplan J.B.* Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses // *J. Dental Res.* 2010. V. 89. P. 205–218.
- Kaplan J.B., Mlynek K.D., Hettiarachchi H., Alamneh Y.A., Biggemann L., Zurawski D.V., Black C.C., Bane C.E., Kim R.K., Granick M.S.* Extracellular polymeric substance (EPS)-degrading enzymes reduce staphylococcal surface attachment and biocide resistance on pig skin *in vivo* // *PLoS One.* 2018. V. 13. Art. e0205526.
- Khan J., Tarar S.M., Gul I., Nawaz U., Arshad M.* Challenges of antibiotic resistance biofilms and potential combating strategies: a review // *3 Biotech.* 2021. V. 11. Art. 169. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02707-w>
- Khoramian B., Emaneini M., Bolourchi M., Niasari-Naslaji A., Gorganzadeh A., Abani S., Hovareshti P.* Therapeutic effects of a combined antibiotic-enzyme treatment on sub-clinical mastitis in lactating dairy cows // *Vet. Med. (Praha).* 2016. V. 61. P. 237–242.
- Komarevtsev S.K., Evseev P.V., Shneider M.M., Popova E.A., Tupikin A.E., Stepanenko V.N., Kabilov M.R., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A.* Gene analysis, cloning, and heterologous expression of protease from a micromycete *Aspergillus ochraceus* capable of activating protein C of blood plasma // *Microorganisms.* 2021. V. 9. Art. 1936.
- Lahiri D., Nag M., Banerjee R., Mukherjee D., Garai S., Sarkar T., Dey A., Sheikh H.I., Pathak S.K., Edinur H.A., Pati S., Ray R.R.* Amylases: biofilm inducer or biofilm inhibitor? // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. Art. 660048.
- Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J.* Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? // *Veterinary J.* 2006. V. 171. P. 398–407.
- O'Toole G.A., Kolter R.* Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 28. P. 449–461.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. V. 49. № 2. P. 411.
- Sauer K., Stoodley P., Goeres D.M., Hall-Stoodley L., Burmolle M., Stewart P.S., Bjarnsholt T.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation // *Nature Revs. Microbiol.* 2022. V. 20. P. 608–620.
- Schwartz S.H.* An overview of the Schwartz theory of basic values // *Online readings in Psychology and Culture.* 2012. V. 2. № 1. Art. 11.
- Taglialegna A., Lasa I., Valle J.* Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds // *J. Bacteriol.* 2016. V. 198. P. 2579–2588.
- Usmani Y., Ahmed A., Faizi S., Versiani M.A., Shamshad S., Khan S., Simjee S.U.* Antimicrobial and biofilm inhibiting potential of an amide derivative [N-(2', 4'-dinitrophenyl)-3β-hydroxyurs-12-en-28-carbonamide] of ursolic acid by modulating membrane potential and quorum sensing against colistin resistant *Acinetobacter baumannii* // *Microb. Pathog.* 2021. V. 157. Art. 104997.
- Vuotto C., Donelli G.* Novel treatment strategies for biofilm-based infections // *Drugs.* 2019. V. 79. P. 1635–1655.

## Degradation of the Biofilms of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by the PAPC Serine protease from *Aspergillus ochraceus*

D. R. Baidamshina<sup>1, \*</sup>, A. Rafia Nasr<sup>1</sup>, S. K. Komarevtsev<sup>2</sup>, A. A. Osmolovskii<sup>3</sup>,  
K. A. Miroshnikov<sup>2</sup>, A. R. Kayumov<sup>1</sup>, and E. Yu. Trizna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

<sup>2</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

<sup>3</sup>Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: dianabaidamshina@yandex.ru

Received October 14, 2023; revised October 27, 2023; accepted November 1, 2023

**Abstract**—Infections associated with biofilm formation by gram-positive and gram-negative microorganisms cause difficulty in therapy and are prone to transition into chronic forms. Approaches to degradation of the biofilm matrix are therefore in demand. In the present work, recombinant recombinant PAPC serine protease from *Aspergillus ochraceus* caused the degradation of mature biofilms formed by a number of gram-positive and gram-negative bacteria by 15–20% at 50 µg/mL. At 100 µg/mL, the biomass of *S. aureus* and *P. aeruginosa* biofilms decreased by 50%. Thus, the PAPC may be a promising agent for biofilm removal and enhance the efficiency of antimicrobial therapy.

**Keywords:** proteolytic enzymes, bacterial biofilms, resistance to antimicrobial agents, biofilm degradation