

На правах рукописи



БАЙДАМШИНА ДИАНА РАФИСОВНА

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ
ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ СТАФИЛОКОККА В СОСТАВЕ
БИОПЛЕНКИ С ПОМОЩЬЮ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**

1.5.11. Микробиология

Автореферат
Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена на кафедре генетики и в научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная генетика микроорганизмов» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: **Каюмов Айрат Рашилович** – доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой генетики Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Официальные оппоненты: **Романова Юлия Михайловна** – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (г. Москва)

Баязитова Лира Табрисовна – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией микробиологии ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (г. Казань)

Ведущая организация: «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (г. Пермь)

Защита диссертации состоится «15» декабря 2022 года в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета КФУ.015.2 ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Сведения о защите, автореферат и диссертация размещены на официальных сайтах ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (<http://kpfu.ru>).

Автореферат разослан «___» 2022 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

О. А. Кравцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Существование в прикрепленной к различным поверхностям форме является преимущественным для большинства микроорганизмов, как составляющих нормальную микрофлору человека и животных, так и патогенных. Бактерии прикрепляются к слизистым оболочкам, зубам, коже и поверхностям медицинских приспособлений (катетеров, имплантатов), и формируют биопленки – трехмерные сообщества микроорганизмов, которые окружены внеклеточным матриксом, также известным как внеклеточное полимерное вещество (extracellular polymeric substance – EPS) [Baishya, Banerjee, 2020].

Благодаря диффузному барьеру, создаваемому матриксом, в составе биопленки многократно повышается устойчивость бактериальных клеток к агрессивным факторам окружающей среды, таким как ионы тяжелых металлов, antimикробные вещества, иммунная система организма хозяина. Поэтому формирование биопленки патогенными бактериями значительно усложняет процесс их эрадикации и удлиняет сроки лечения заболевания. Более того, от биопленки отслаиваются скопления бактериальных клеток, которые также оказываются защищены от внешних факторов, и, переносясь в новые ниши, приводят к их колонизации и возникновению рецидивирующих инфекций [Coenye, 2010; Hurlow *et al.*, 2015; Vestby *et al.*, 2020].

Условно-патогенные бактерии *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* являются распространенными комменсалами человека. В условиях подавленного иммунитета эти оппортунистические патогены активно размножаются и приводят к развитию тяжелых инфекционных заболеваний, в том числе внутрибольничных инфекций, часто со смертельным исходом [Friedrich, 2019; Monegro *et al.*, 2020; Kranjec *et al.*, 2021]. *S. aureus* и *S. epidermidis* являются наиболее частой причиной инфекций, связанных с образованием биопленки на поверхностях имплантатов, протезов и катетеров, где бактериальные агрегаты плотно прилегают к поверхности биоматериала [Roberts *et al.*, 2015]. Также бактериальные биопленки возникают на поверхности ран, таких как ожоги, венозные язвы на ногах, пролежни и диабетические язвы стопы [Wu, *et al.*, 2019]. Поскольку иммунный ответ организма-хозяина и обычные противомикробные препараты часто оказываются неэффективными против бактерий в составе биопленки, возникает хроническое воспаление [Coenye, 2010; Sharahi *et al.*, 2019].

В последние годы уже существует понимание необходимости учитывать сложности лечения инфекций, ассоциированных с образованием биопленок. Следовательно, требуется разработка подходов, направленных на повышение чувствительности бактерий в составе биопленок к antimикробной терапии [Xu *et al.*, 2021]. Так, для решения данной задачи предлагается использовать наночастицы серебра (NPs), хорошо известные своим antimикробным потенциалом и способностью уменьшать объем и

биомассу бактериальной биопленки [de Faria *et al.*, 2014; Fabrega *et al.*, 2011; Chhibber *et al.*, 2017; Montazeri *et al.*, 2020]. Еще одним инструментом могут служить эфирные масла, которые действуют на бактериальную биопленку и способны многократно повышать эффективность ряда антибиотиков, таких как норфлоксацин, оксациллин и гентамицин, хотя механизм потенцирования остается неизвестным [Rosato *et al.*, 2020]. Также в качестве альтернативных antimикробных препаратов активно исследуются бактериоцины, которые оказывают бактерицидное действие, вызывая повреждение мембранны и последующую гибель клеток [Hong *et al.*, 2018]. Кроме того, описаны синтетические производные 2(5H)-фуранона, которые способствуют ингибированию образования биопленок грамположительных бактерий [Тризна, 2019]. Однако, несмотря на большое количество предложенных подходов для деструкции биопленок стафилококка, в настоящее время нет общепринятого эффективного инструмента.

Ферментативная деструкция матрикса биопленок является одним из привлекательных подходов к терапии благодаря таким свойствам ферментов, как биоразлагаемость, низкая токсичность в отношении клеток человека и отсутствие развития резистентности к ним у бактерий [Torres *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014; Bulonza, 2022]. Несмотря на перспективность применения, ферменты обладают рядом недостатков, такими как низкая стабильность при хранении и подверженность деградации собственными протеазами организма. Другим объективным ограничением применения ферментов в качестве деструкторов микробной биопленки являются сложности их использования для наружного применения, такие как отсутствие форм для нанесения и удержания на поверхности, а также длительного хранения раствора фермента без потери активности. Эти проблемы можно решить путем иммобилизации ферментов, которая позволяет повысить их стабильность в широких пределах pH, температуры, растворителей, загрязнения и примесей, а также дает возможность включения в перевязочный материал. Одной из эффективных водонерастворимых подложек для иммобилизации ферментов является хитозан, продукт деацетилирования хитина. Хитозан является биоразлагаемым, биосовместимым, нетоксичным, гидрофильным, дешевым носителем [Nunes *et al.*, 2021] и обладает антибактериальными свойствами [Kulikov *et al.*, 2009].

Цель и задачи исследования

Целью работы было выявить гидролитические ферменты, приводящие к максимальной деструкции биопленок стафилококка, и обосновать целесообразность их применения в растворимой и иммобилизованной форме для терапии наружных инфекций, ассоциированных с образованием бактериальной биопленки.

В работе решались следующие задачи:

1) Провести сравнительную оценку деструкции биопленок *S. aureus* и *S. epidermidis*, а также двувидовых биопленок, образованных *S. aureus* и рядом наиболее часто встречающихся ассоциантов, различными

гидролитическими ферментами и определить наиболее эффективные препараты.

2) Охарактеризовать степень повышения эффективности антимикробных препаратов в отношении клеток стафилококков в составе биопленки при сочетанном действии антимикробных препаратов с гидролитическими ферментами.

3) Оценить возможность использования папаина и фицина, иммобилизованных на матрице хитозана, для разрушения матрикса стафилококковых биопленок, и определить степень повышения эффективности антимикробных препаратов в их присутствии в отношении стафилококков, погруженных в биопленку.

4) Получить модель инфицированного повреждения кожи у крыс и оценить на данной модели влияние фицина в растворимой и иммобилизованной на хитозане формах на эффективность антибиотикотерапии и скорость ранозаживления.

Научная новизна полученных результатов

В ходе выполнения работы впервые показано, что протеолитические ферменты фицин и папаин, а также коньюгат гиалуронидазы с полиоксидонием (препарат Лонгидаза[®]) способны разрушать матрикс стафилококковых биопленок. При этом остаточная биопленка составляет 20-50% от исходной после 24 ч инкубации с данными ферментами с конечными концентрациями 1 мг/мл. Фицин и папаин в 2 раза снижают биомассу двувидовых биопленок *S. aureus* – *E. coli* и *S. aureus* – *E. faecalis*. Препарат Лонгидаза[®] в концентрации 750 МЕ/мл значительно снижает биомассу двувидовых бактериальных биопленок *S. aureus* – *E. coli*, *S. aureus* – *E. faecalis*, *S. aureus* – *P. aeruginosa*, и в меньшей степени разрушает биопленку *S. aureus* – *K. pneumoniae*.

Сочетанное применение протеаз с антимикробными препаратами снижает в 2–8 раз концентрацию ципрофлоксацина, гентамицина и хлорида бензалкония, необходимую для уменьшения на 3 порядка количества КОЕ бактерий в составе биопленки (условие терапевтического эффекта). Препарат Лонгидаза[®] способен потенцировать активность цефуроксима в отношении биопленок золотистого стафилококка (снижение МБК достигает 16 раз).

В работе впервые показано, что иммобилизованные на среднемолекулярном хитозане ($M = 200$ кДа) фицин и папаин приводят к разрушению стафилококковых биопленок и повышают эффективность антимикробных препаратов при сочетанном применении.

Установлено, что растворимая и иммобилизованная форма фицина способна повышать скорость заживления и очищения кожной раны у крыс при применении как отдельно, так и в комплексе с антибактериальными средствами. При этом применение иммобилизованного на хитозане фицина приводит к формированию структуры коллагена, по плотности и дисперсии тензора близкого к нативной ткани.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач применяли комплекс микробиологических, биохимических и гистологических методов исследования. Для исследования структуры бактериальных биопленок применяли методы подсчета КОЕ и микроскопии (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия). Работы с лабораторными животными проводили в соответствии с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (Страсбург, 1986). Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 14 от 08.02.2019 г.).

Достоверность результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается большим количеством биологических повторов, проведенных с использованием современных и общепризнанных методов, применяемых на сегодняшний день в лабораторной практике, и выполненных на современном оборудовании. Выносимые на защиту положения диссертации опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, и представлены на всероссийских и зарубежных конференциях.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования результаты имеют как фундаментальный, так и практический интерес. Полученные в работе результаты расширяют теоретические знания об особенностях влияния различных ферментов на моно- и двувидовые биопленки, образованные стафилококками и другими условно-патогенными бактериями.

Показанные в ходе исследования деструкция фицином, папаином и препаратом Лонгидаза® биопленок, образованных *S. aureus* и *S. epidermidis*, а также двувидовых биопленок золотистого стафилококка с *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, а также потенцирование антимикробных препаратов в отношении бактерий в составе данных биопленок при сочетании с ферментами, является теоретической основой для создания комплексных препаратов и принципов лечения для терапии наружных инфекций, ассоциированных с образованием биопленок. При этом, так как препарат Лонгидаза® разрешен к использованию в виде раствора и суппозиториев, данный фермент может быть использован для разрушения биопленок стафилококка в урогенитальном тракте.

Иммобилизованный на хитозане фицин и его растворимая форма, которые способствуют ранозаживлению и снижению микробной обсемененности кожных ран, представляют интерес для включения в перевязочные материалы для ускорения заживления ран, предотвращая их биообрастание и повышая эффективность антимикробного лечения инфицированных ран.

Таким образом, полученные в работе результаты могут быть рекомендованы при разработке новых подходов для терапии инфекций, ассоциированных с образованием бактериальных биопленок, и соответствуют п. 20. в Стратегии научно-технического развития Российской Федерации (переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных), а также п.5 Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности.

Основные положения, выносимые на защиту

- Растительные протеиназы фицин и папаин, а также препарат Лонгидаза® разрушают матрикс биопленок, образованных *S. aureus* и *S. epidermidis*, а также двувидовых биопленок золотистого стафилококка с *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.
- Протеолитические ферменты фицин и папаин в растворимой и иммобилизованной на хитозане формах снижают МБК ципрофлоксацина, гентамицина и хлорида бензалкония до 8 раз в отношении клеток стафилококков, погруженных в матрикс биопленки.
- Растворимый и иммобилизованный на хитозане фицин повышает скорость заживления ран и микробной деконтаминации в модели инфицированного повреждения кожи у крыс. Обработка ран иммобилизованным на хитозане фицином приводит к формированию структуры коллагена, по плотности и дисперсии тензора близкого к нативной ткани.

Апробация работы и публикации

Материалы диссертационной работы представлены на 17 международных и российских конференциях, таких как Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пущино, 2014, 2015, 2016); Международная научно-практическая конференция "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине" (Казань, 2014, 2018); Всероссийская школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2014, 2021); Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2017); Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015); III Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2018); Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2019, 2020, 2021); II Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего – Наука молодых» (Казань, 2016); Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020); Научное собрание Европейского общества клинических исследований, онлайн собрание (2020, 2021).

Место выполнения работы и личный вклад автора

Работа выполнена на кафедре генетики и в научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная генетика микроорганизмов» Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет. Непосредственный вклад соискателя совместно с научным руководителем направлен на формулировку цели и постановку задач исследований. Автором диссертации выполнена основная экспериментальная часть работы, анализ результатов и формулировка выводов. Публикации статей проводились совместно с соавторами.

Иммобилизация ферментов на хитозанах проводилась сотрудниками Воронежского государственного университета под руководством проф. В.Г. Артюхова.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия проводилась в сотрудничестве с сотрудниками научно-исследовательской лаборатории «Бионанотехнологии» на базе центра коллективного пользования Казанского (Приволжского) федерального университета «Аналитическая микроскопия». Сканирующая электронная микроскопия проводилась сотрудниками центра коллективного пользования Лимнологического Института СО РАН.

Экспериментальная часть на моделях *in vivo* проводилась на базе НОЦ Фармацевтики «Отдел доклинических исследований» совместно с М.Н. Агафоновой.

Подготовка гистологических препаратов проведена доцентом кафедры Зоологии и общей биологии Института фундаментальной медицины и биологии КФУ А.Г. Порфириевым. Обработка гистологических изображений по направлению ориентации коллагена проводилась к.ф.-м.н., доцентом Института математики и механики им. Н.И. Лобачевского КФУ О.А. Саченковым.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 19-34-90061 Аспирант (2019-2021), РНФ 15-14-00046 (2015-2017), при поддержке стипендии Президента Российской Федерации (2019-2021), в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета и Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Публикация результатов исследования

По материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах РИНЦ, Web of Science, Scopus и 1 монография.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа представлена в 154 страницах, содержит 25 рисунков и 3 таблицы, список литературы содержит 295 библиографических источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали ферменты: ДНКаза, бромелин, папаин, трипсин, а также антибиотики: амоксициллин, гентамицин, цефуроксим, ципрофлоксацин и бензалкония хлорид, приобретенные в компании Sigma (США). Фицин был приобретен в компании MP Biomedicals (США), в экспериментах *in vivo* использован фермент производства Sigma (США). Препарат Лонгидаза® был предоставлен ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия. Коммерческий препарат «Химотрипсин» произведен компанией Самсон-Мед, Россия. Иммобилизованные на хитозане фицин и папаин были получены ранее на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, и предоставлены проф. В.Г. Артюховым.

Штаммы

В работе использовали музейные штаммы (Американская коллекция микроорганизмов): *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™). Клинические изоляты: *Staphylococcus epidermidis* (Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии), *Klebsiella pneumoniae* (Институт медицинской микробиологии, Гиссен, Германия). Метициллин-чувствительные штаммы (MSSA) *S. aureus* 18, *S. aureus* 25, *S. aureus* 26 и метициллин-резистентные штаммы (MRSA) *S. aureus* 67, *S. aureus* 73 предоставлены сотрудниками НОЦ Фармацевтики КФУ.

Методы получения биопленок и определения жизнеспособности клеток в их составе

МПК и МБК antimикробных препаратов определяли согласно рекомендациям EUCAST и МУК 4.2.1890—04.

Для получения биопленок бактериальную культуру начальной плотностью 3×10^7 КОЕ/мл выращивали 2 суток без качания при 37 °C на среде БМ (пептон – 0.7 г/л; глюкоза – 0.5 г/л; MgSO₄×7H₂O – 0.2 г/л; CaCl₂ – 0.005 г/л) в 96-ти или 24-х луночных адгезивных пластиковых планшетах (Eppendorf Cell Culture Plates).

Окрашивание биопленок проводили с использованием красителя кристаллического фиолетового. Лунки промывали дистиллированной водой, просушивали в течение 24 ч и окрашивали 20 мин 1% спиртовым раствором красителя, после чего лунки трижды промывали дистиллированной водой, элюировали краситель 96% этианолом и измеряли поглощение при длине волны 570 нм на микропланшетном ридере Tecan Infinite200Pro (Швейцария).

Количество жизнеспособных клеток (КОЕ) в составе биопленки определяли путем механического ресуспендирования биопленки с обработкой ультразвуком в течение 2 мин и последующей подготовкой 10-кратных серийных разведений бактериальной суспензии в 0.9% NaCl, после чего полученную суспензию высевали по 3 мкл на чашки с агаризованной средой и после 24 ч инкубации при 37 °C проводили подсчет КОЕ. Также

количество жизнеспособных клеток оценивали с использованием метаболического МТТ-теста.

Микроскопия

Флуоресцентную микроскопию проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Carl Zeiss LSM 780 (Германия) в 8-луночных слайдах (Eppendorf Cell Imaging Coverglass). Жизнеспособные и погибшие клетки окрашивали пропидий йодидом (3 мкг/мл) и DioC6 (0.02 мкг/мл).

Снимки сканирующей электронной микроскопии фиксированных микробных биопленок были получены с помощью сканирующего электронного микроскопа в ЦКП «Ультрамикроанализ» в Лимнологическом Институте СО РАН, г. Иркутск, на микроскопе Quanta 200 (компания FEL, США) при напряжении 29 кВ. Биопленки промывали водой и фиксировали глутаровым альдегидом (1% водный раствор) в течение 4 часов. После последующей промывки деионизированной водой чашки высушивались в течение 12 ч при 55 °С и покрывались в вакууме золотом на SCD 004 (Balzers AG, Лихтенштейн). Из каждого образца анализировали 10 полей зрения.

Атомно-силовую микроскопию высушенных микробных биопленок проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Dimension Icon (Bruker, США) в режиме PeakForce Tapping™. Использовались зонды Scan Asyst-Air (Bruker) с номинальной длиной 115 мкм, радиусом наконечника 2 нм, постоянной пружины 0.4 Н/м. Полученные необработанные данные АСМ-изображений обрабатывались и анализировались с помощью программного обеспечения Nanoscope Analysis v.1.7 (Bruker).

Создание модели раневых повреждений кожи у крыс, изучение скорости заживления и микробной обсемененности ран

Работы проводили с соблюдением этических норм и с одобрения Локального этического комитета Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 14 от 08.02.2019 г.). Животным проводили анестезию (ингаляционная анестезия, изофлуран (Baxter, США); индукция – 3-4%, 2 мин, 1 л/мин, базовая – 1-2%) [Kazakova, Luong, 2016], в паравертебральной области крыс с использованием стерильного скальпеля была создана круглая рана диаметром 1 см. Затем на рану наносили 100 мкл суспензии клеток *S. aureus*, содержащей 10⁹ КОЕ/мл в 0.9% растворе NaCl.

Фотодокументация ран проводилась ежедневно во время лечения до 15-го дня для оценки изменений в размерах раны, наличия крови и образования рубцов. Процесс заживления оценивался по измерению площади раны как $((S-S_t)/S) \times 100\%$, где S_t и S - площадь раны на определенный день «т» и сразу после операции, соответственно [Lundeberg *et al.*, 1992; Cukjati *et al.*, 2001]. Через каждый 24 часа с раневых поверхностей с площади равной 1 см² брали мазки в стерильные пробирки, содержащие 1 мл стерильного 0.9% физиологического раствора, и подсчитывали КОЕ на маннитол-солевом агаре.

Для гистологического анализа образцы из ран (эпидермис, дерму и подкожную мышцу panniculus carnosus) фиксировали 24 часа в 10% растворе

формалина в PBS. Затем получали срезы толщиной 5 мкм (на микротоме Thermo Scientific HM325), обезвоживали и окрашивали по Мэллори или гематоксилином/эозином. Гистологические образцы изучали на микроскопе Carl Zeiss Axio Imager2 с увеличением 100× или 200× по 10 полей на образец.

Статистическая обработка результатов

Эксперименты были проведены в трех биологических повторах с тремя техническими повторами в каждом. Статистическую значимость результатов оценивали по критерию Крускала-Уоллиса с уровнем значимости $p < 0.05$. Количественную оценку площади ран проводили с помощью собственного программного обеспечения BioFilmAnalyzer [Bogachev *et al.*, 2018]. Качество восстановления дермы, ориентацию и плотность коллагеновых волокон оценивали, по методам, описанным Семеновой с соавт. [Semenova *et al.*, 2019; Yaikova *et al.*, 2019; Kharin *et al.*, 2019]. Для оценки направления ориентации коллагена гистологические изображения выравнивали по двухмерной декартовой сетке, и для каждого элемента рассчитывалась средняя длина перехвата (MIL) [Harrigan, Mann, 1984], затем находили подходящий эллипс и далее вычисляли собственные значения и векторы. Удлинение коллагена оценивали по соотношению собственных значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Ферментативная деструкция биопленок стафилококка гидролитическими ферментами

Среди шести исследуемых препаратов, протеолитические ферменты приводили к наибольшему снижению биомассы биопленок стафилококков. Так, после инкубации с фицином и папаином (раствор 1 мг/мл в PBS) остаточная биопленка бактерий *S. aureus* и *S. epidermidis* была значительно снижена (Рисунок 1), по всей видимости, благодаря тому, что в составе стафилококковых биопленок доминирует белковый компонент, который и подвергается протеолизу [Mazmanian *et al.*, 2000; Sharahi *et al.*, 2018]. Электронная микроскопия биопленок подтвердила уменьшение толщины биопленки и снижение количества клеток *S. aureus* и *S. epidermidis* при обработке фицином и папаином (Рисунок 2).

Препарат Лонгидаза® (750 МЕ) приводил к разрушению биопленок *S. aureus* на 40%. Можно предположить, что препарат снижает вязкость внеклеточного матрикса за счет разрушения полисахаридов (Рисунок 1). При проведении микроскопии визуализировалось значительное уменьшение количества клеток в биопленке, но наблюдалось значительно большее количество экзополимерного вещества. Вероятно, изменение вязкости матрикса за счет присутствия гиалуронидазы способствовало выбросу клеток из биопленки (Рисунок 2).

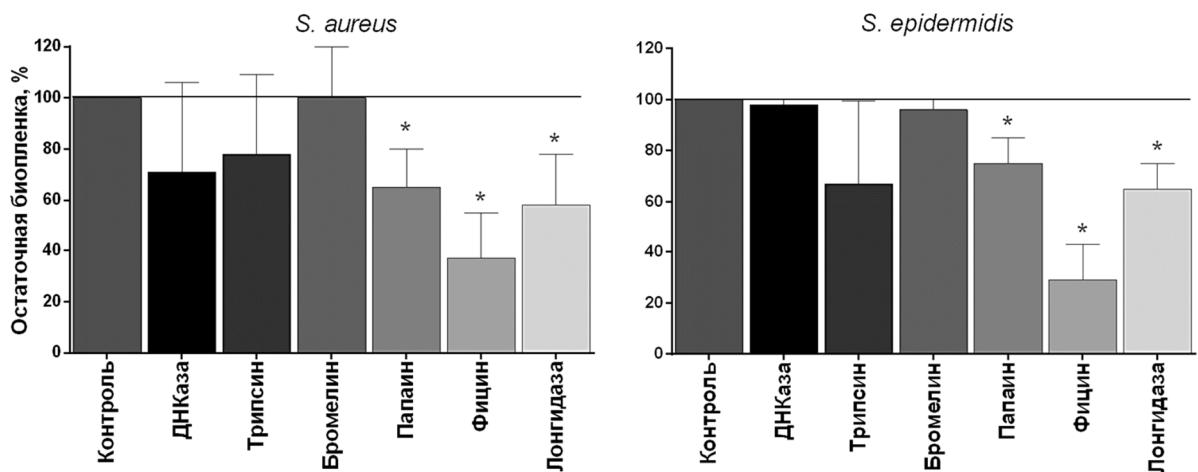


Рисунок 2 – Влияние гидролитических ферментов на биомассу биопленки *S. aureus* и *S. epidermidis*. Двухсуточные биопленки инкубировали 24 часа с различными ферментами (концентрация 1 мг/мл, для препарата Лонгидаза® – 750 МЕ). Остаточную биопленку оценивали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Приведены средние значения ± стандартное отклонение. Разницу с контролем считали достоверной при $p < 0.05$

В некоторых исследованиях показано, что клинические изоляты *S. aureus* образуют биопленки с разным содержанием PNAG (поли-N-ацетилглюкозамина) и белков [Hurlow *et al.*, 2015; Vestby *et al.*, 2020;], поэтому эффективность ферментов может отличаться в отношении биопленок разных изолятов стафилококка. Действие фицина, папаина (1 мг/мл) и препарата Лонгидаза® (750 МЕ) в отношении клинических изолятов оценивали путем окраски остаточной биопленки кристаллическим фиолетовым. Все три фермента показали сопоставимые результаты по деструкции биопленок, образованных четырьмя штаммами клинических изолятов MSSA и 2 штаммами MRSA (Рисунок 3).

Хотя все исследуемые ферменты разрушали биопленки всех изолятов, больший эффект наблюдался в отношении биопленок MRSA. Скорее всего, это связано с различиями в составе матрикса. Чтобы подтвердить эту гипотезу, была проведена оценка содержания клеточных и внеклеточных компонентов биопленки данных изолятов (Рисунок 4). Биопленка изолятов MRSA содержала больше полисахаридов в матриксе, что может быть объяснением их более глубокой деструкции препаратом Лонгидазы®. С другой стороны, прочность полисахаридного каркаса в биопленках стафилококка обеспечивается белками, и гидролиз последних также приводит к нарушению структуры биопленки фицином и папаином.

В последнее время показано, что многие заболевания ассоциированы с формированием смешанных биопленок [Hamzah *et al.*, 2020]. Поэтому была проведена оценка разрушения моно- и двувидовых биопленок фицином, папаином и препаратом Лонгидаза®.

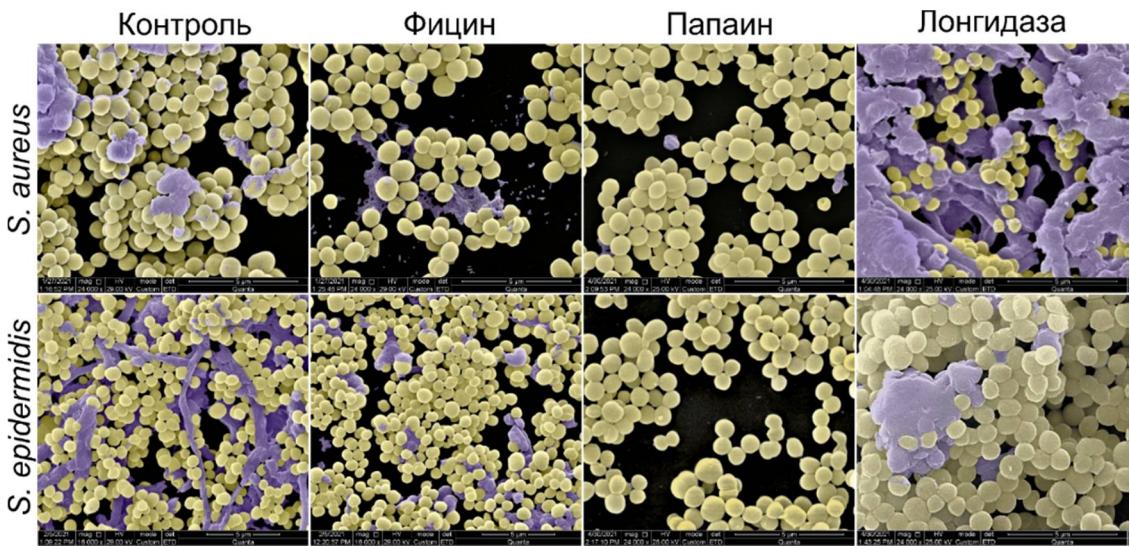


Рисунок 2 – Сканирующая электронная микроскопия 48-часовых биопленок *S. aureus* и *S. epidermidis* до и после 24 ч обработки фицином, папаином (1 мг/мл) или препаратом Лонгидаза® (750 МЕ)

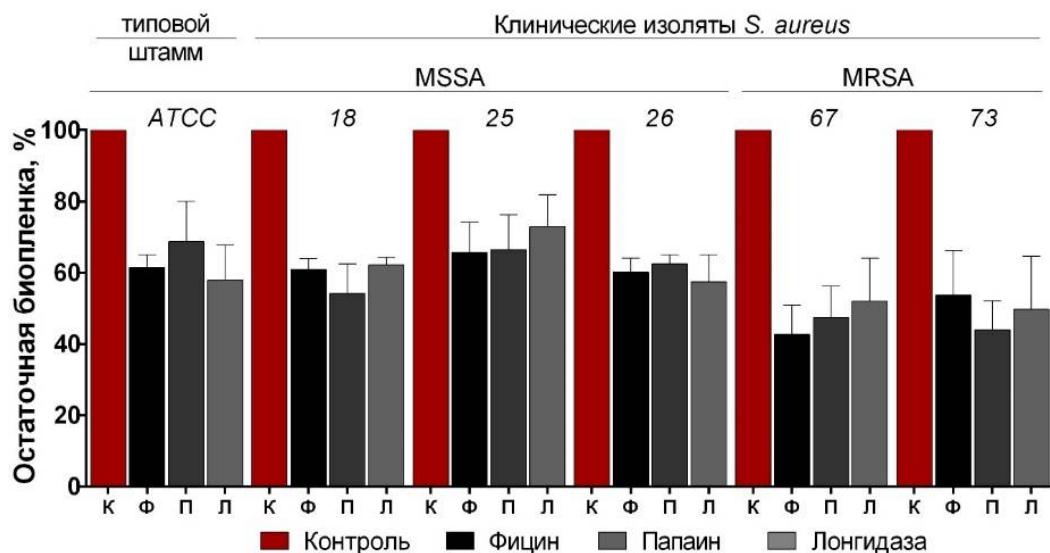


Рисунок 3 – Оценка деструкции биопленок клинических изолятов *S. aureus* (Ф)-фицином, (П)-папаином (1 мг/мл) и (Л)-препаратором Лонгидаза® (750 МЕ). Остаточную биопленку оценивали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым и выражали в % от биомассы необработанной биопленки каждого изолята

Препарат Лонгидаза® в концентрации 750 МЕ приводил к снижению остаточной биомассы двувидовых биопленок до 50%. Фицин и папаин приводили к значительной деструкции только биопленок *S. aureus* – *E. coli* и *S. aureus* – *E. faecalis*, однако в отношении биопленок других сочетаний бактерий протеазы оказались малоэффективными (Рисунок 6). Это соотносится с эффектом ферментов на биопленки монокультур: фицин и папаин разрушали биопленки штаммов *S. aureus* и *E. faecalis* во всех концентрациях. Однако действие фицина было значимым лишь на биопленки кишечной палочки, а папаин действовал на биопленки *P. aeruginosa* при концентрации 4 мг/мл (Рисунок 5).

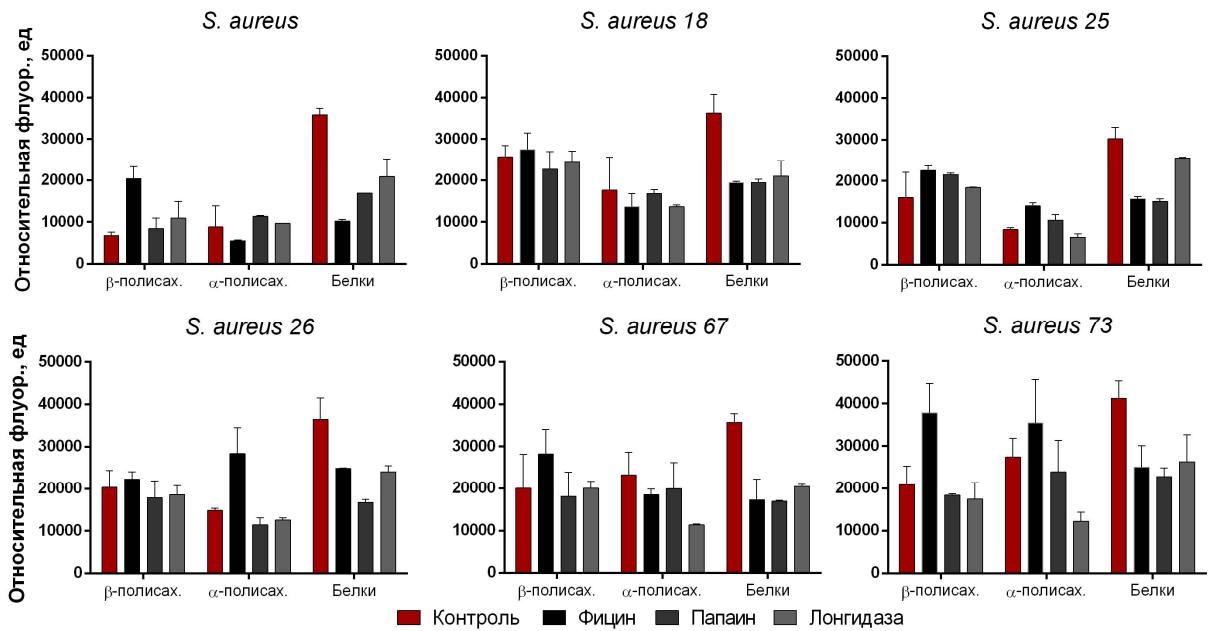


Рисунок 4 – Оценка содержания клеточных и внеклеточных компонентов биопленки типового штамма и клинических изолятов *S. aureus* с помощью дифференциального флуоресцентного окрашивания до и после 24 часов обработки фицином, папаином (1 мг/мл) и препаратом Лонгидаза® (750 МЕ)

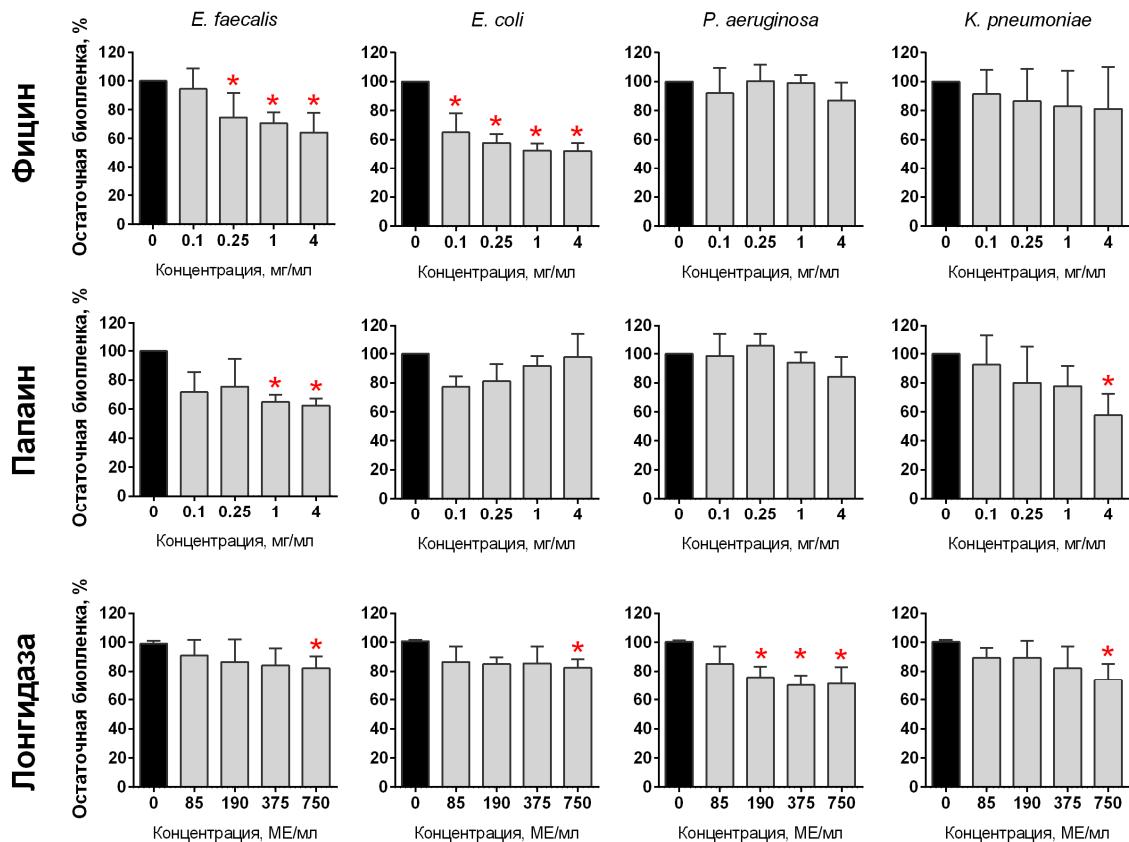


Рисунок 5 – Влияние 24 часов инкубации с фицином, папаином (1 мг/мл) и препаратом Лонгидаза® (750 МЕ) на биомассу 48-часовых биопленок, образованных грамположительными и грамотрицательными бактериями. Остаточную биопленку оценивали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Приведены средние значения ± стандартное отклонение. Достоверность оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса. * $p < 0.10$

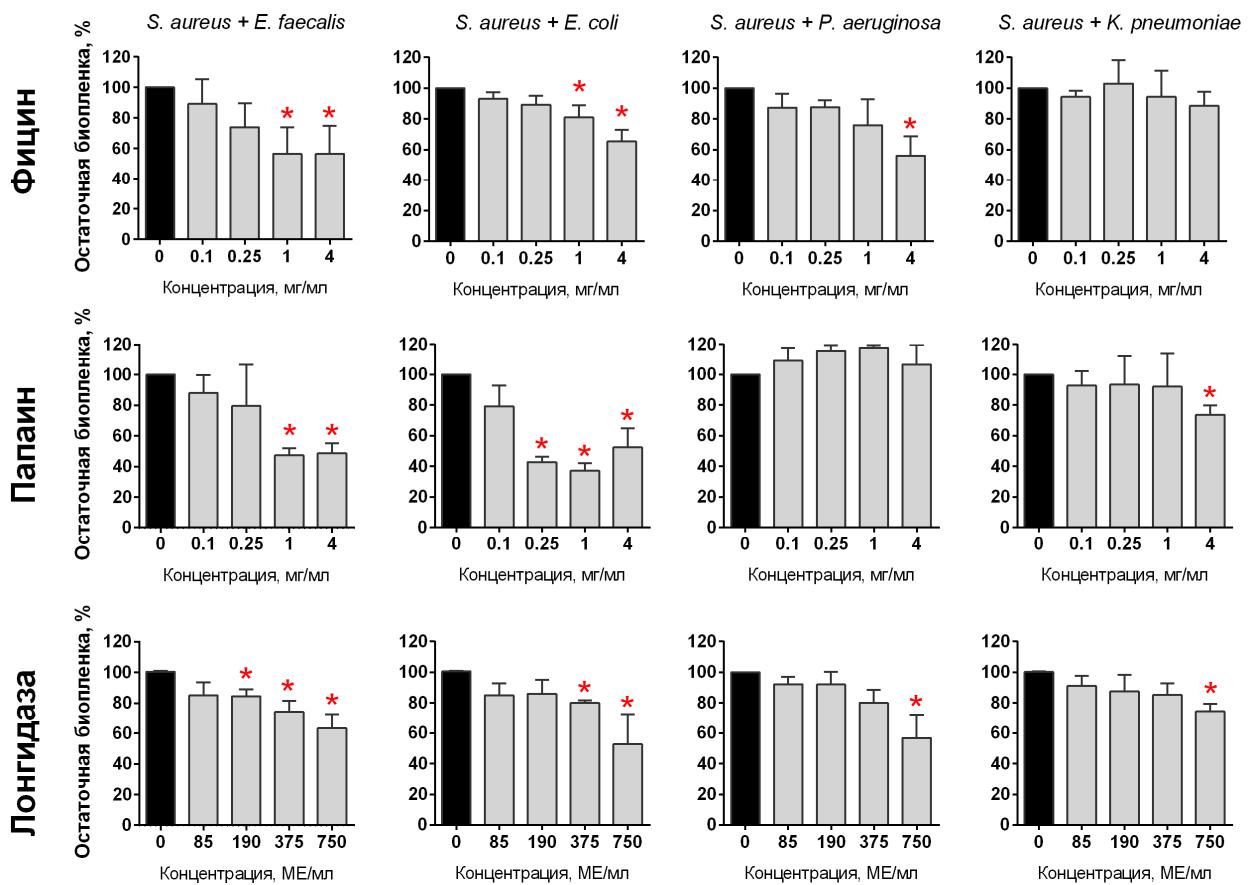


Рисунок 6 – Разрушение двувидовых биопленок фицином, папаином и препаратом Лонгидаза® после 24 часов инкубации. Оценка остаточной биопленки с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Достоверность оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса. * $p<0.05$

2 Исследование возможности повышения эффективности антибиотиков в отношении *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* в составе биопленок

Деструкция матрикса является способом повышения эффективности антибиотиков в отношении клеток бактерий в биопленках. Действительно, сочетание ферментов с антибиотиками приводило к повышению чувствительности стафилококков в составе биопленок по сравнению с монотерапией антимикробными препаратами. Условием достижения терапевтического эффекта является снижение количества КОЕ более чем на 3 порядка. Сочетание фицина (1 мг/мл) с ципрофлоксацином ($8\times$ МБК) позволило снизить количество КОЕ стафилококков на 3 порядка, тогда как применение одного только антибиотика не приводило к подобному эффекту (Рисунок 7). В случае бензалкония хлорида снижение КОЕ на 3 порядка наблюдалось при $4\times$ МБК антисептика, тогда как при сочетании с фицином тот же эффект мог быть получен при $2\times$ МБК вещества (Рисунок 8). Аналогичные результаты были получены при использовании комбинаций антибиотиков с папаином (Рисунок 9).

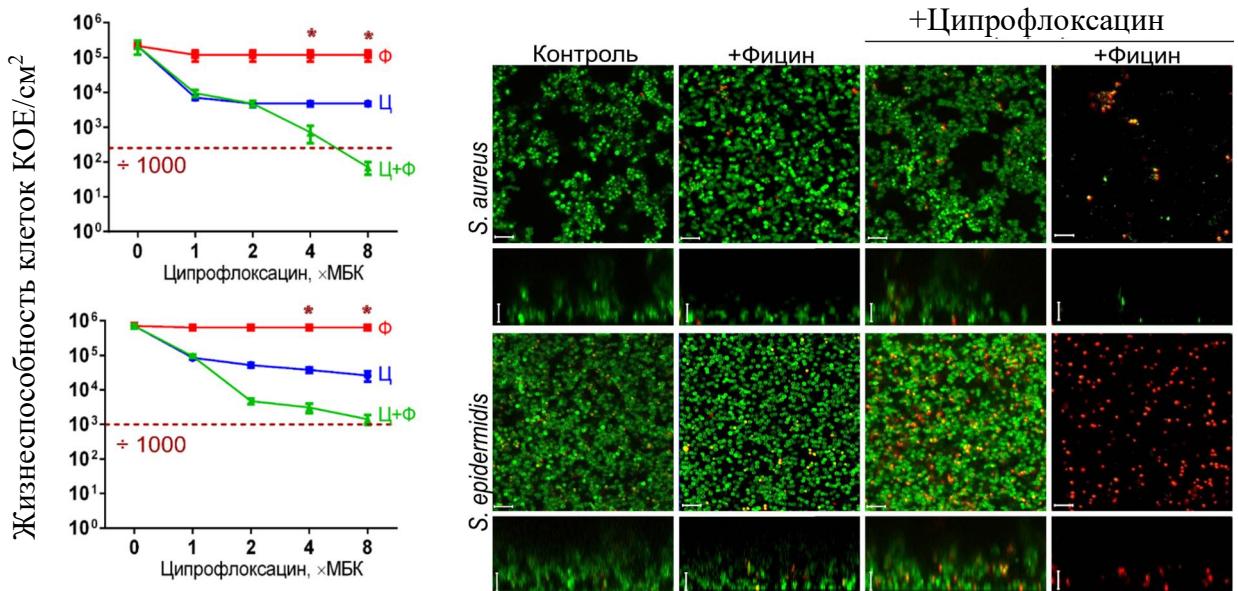


Рисунок 7 – Влияние фицина (Φ) (1 мг/мл) на целостность биопленки и эффективность ципрофлоксацина (Ц) против клеток $S. aureus$ и $S. epidermidis$ в составе сформированной биопленки. Для КОЕ приведены медиана \pm ИКР. Достоверность оценивали с помощью критерия согласия Пирсона. * $p<0.05$. На микрофотографиях бар соответствует 10 мкм

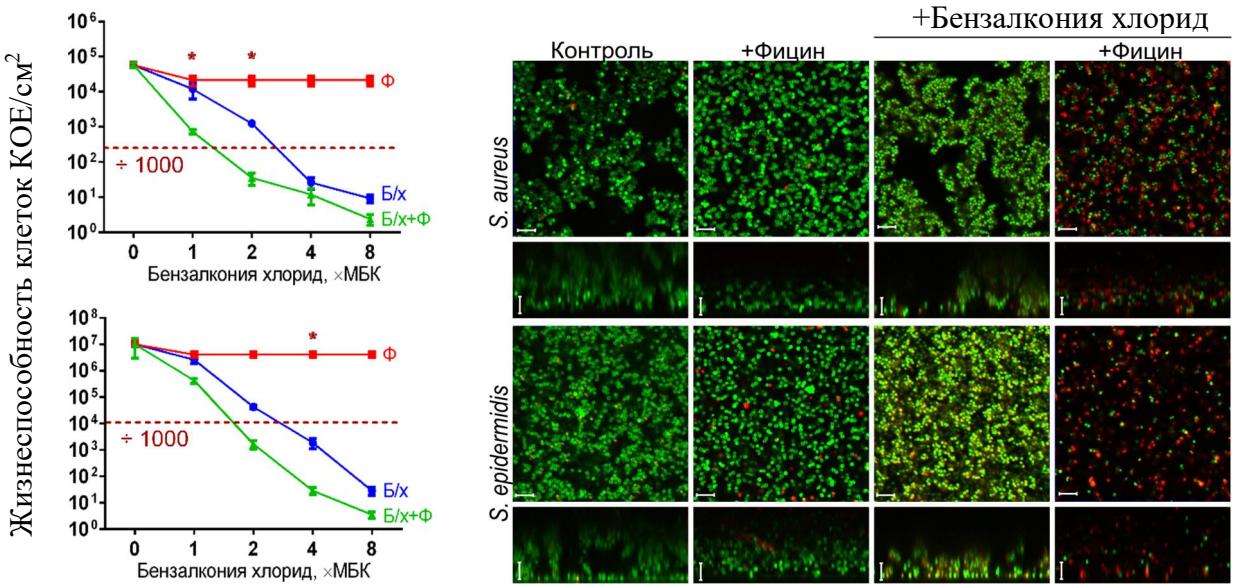


Рисунок 8 – Влияние фицина (Φ) (1 мг/мл) на целостность биопленки и эффективность бензалкония хлорида (Б/х) против клеток $S. aureus$ и $S. epidermidis$ в составе сформированной биопленки. Для КОЕ приведены медиана \pm ИКР. Достоверность оценивали с помощью критерия согласия Пирсона. * $p<0.05$. На микрофотографиях бар соответствует 10 мкм

Препарат Лонгидаза® используется для лечения урогенитальных заболеваний, поэтому исследовали эффект его сочетания с антибиотиками, назначаемыми в случае инфекций урогенитального тракта. Так, сочетание препарата (750 МЕ) с цефуроксимом приводило к повышению чувствительности $S. aureus$ к последнему в 4 раза, хотя в случае амоксициллина и ципрофлоксацина достоверной разницы при монотерапии и комплексной обработке с Лонгидазой® установлено не было (Рисунок 10).

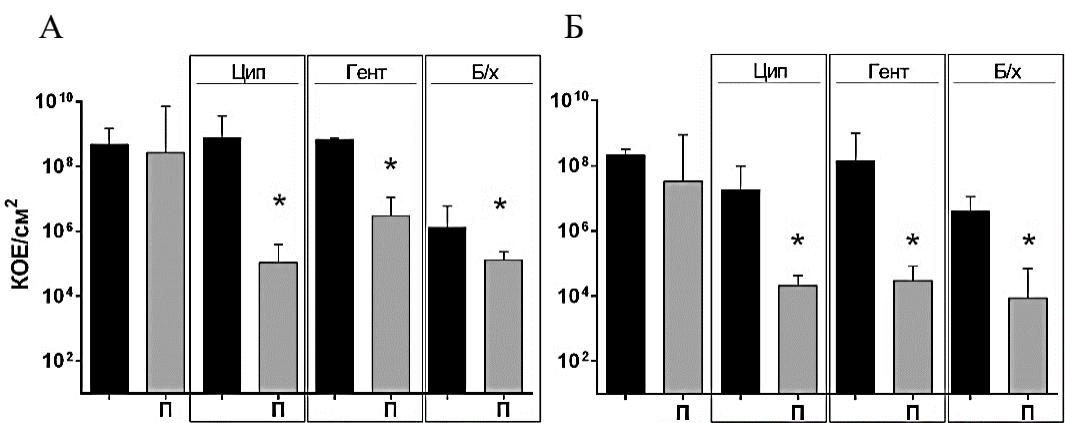


Рисунок 9 – Влияние папаина (1 мг/мл) на эффективность антимикробных препаратов против клеток *S. aureus* (А) и *S. epidermidis* (Б) в составе сформированной биопленки (П-папайн, Цип-ципрофлоксацин, Гент-гентамицин, Б/х-бензалкония хлорид 8×МБК). Приведены медиана ± интерквартильный размах. Достоверность оценивали с помощью критерия согласия Пирсона. *p<0.05

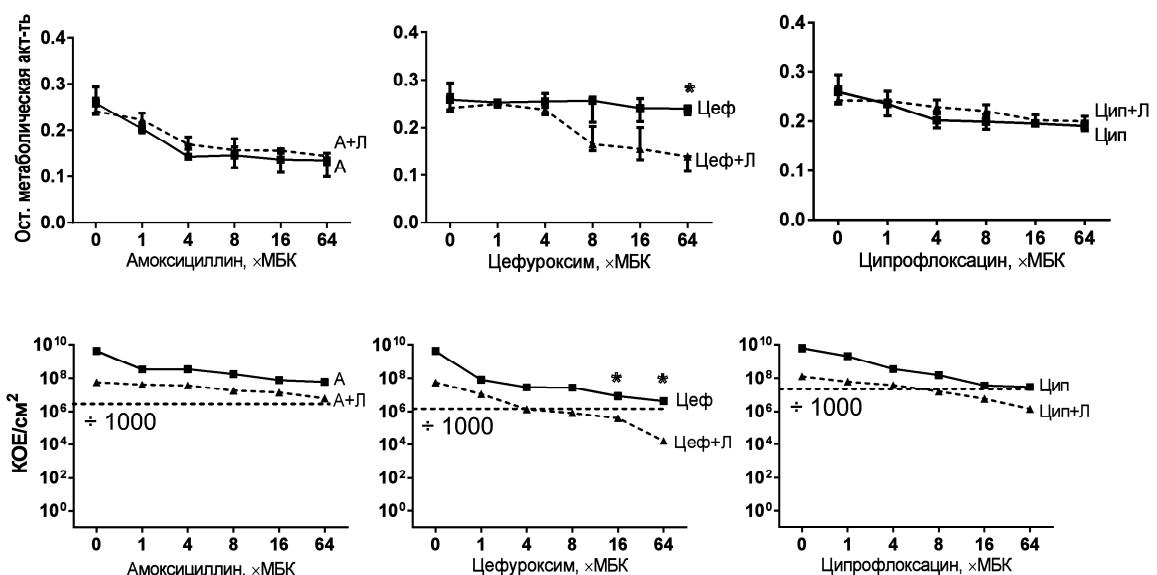


Рисунок 10 – Влияние препарата Лонгидаза® (750 МЕ) на эффективность антибиотиков против клеток *S. aureus* в составе сформированной биопленки. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью метаболического МТТ-теста (среднее значение ± СКО) и подсчета КОЕ (медиана ± интерквартильный размах). Достоверность оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса и согласия Пирсона, соответственно. *p<0.05

3 Эффект иммобилизованных на хитозане фицина и папаина на биопленки стафилококка

Несмотря на успешное применение протеаз в лечении ран, сообщается о некоторых недостатках этого подхода, включая низкую стабильность при хранении, деградацию под действием протеаз хозяина и бактерий, а также трудности в регулировании точной дозировки и времени экспозиции применения ферментов [Klasen, 2000; McCarty *et al.*, 2012; Liese, Hilterhaus,

2013]. Иммобилизация протеолитических ферментов на нерастворимых носителях является распространенным подходом к частичному преодолению вышеуказанных ограничений путем улучшения их стабильности, защиты от автолиза и продления периода полураспада фермента [Mateo *et al.*, 2007; Fernandez-Lafuente, 2009; Garcia-Galan *et al.*, 2011]. Сотрудниками Воронежского университета фицин и папаин были иммобилизованы на хитозане с молекулярной массой около 200 кДа. Данные ферментные препараты в концентрациях, содержащих 1 мг/мл чистого белка, были исследованы на способность разрушать биопленки. В качестве негативного контроля использовали чистый хитозан.

Фицин и папаин в иммобилизованной форме сохраняли свою способность разрушать биопленки стафилококков и повышать эффективность антимикробных препаратов против клеток *S. aureus* в составе биопленки в 2-4 раза, хотя этот эффект был менее выражен по сравнению с применением растворимых ферментов (Рисунок 11-12). Вероятно, это объясняется тем, что крупные молекулы хитозана не могут диффундировать в толщу биопленки для доставки фермента, в отличие от его растворимой формы, которая легко проникает в матрикс. Интересно также, что хитозан подавлял активность антибиотиков, вероятно, либо за счет образования диффузационного барьера, либо за счет сорбции антимикробных препаратов на его поверхности.

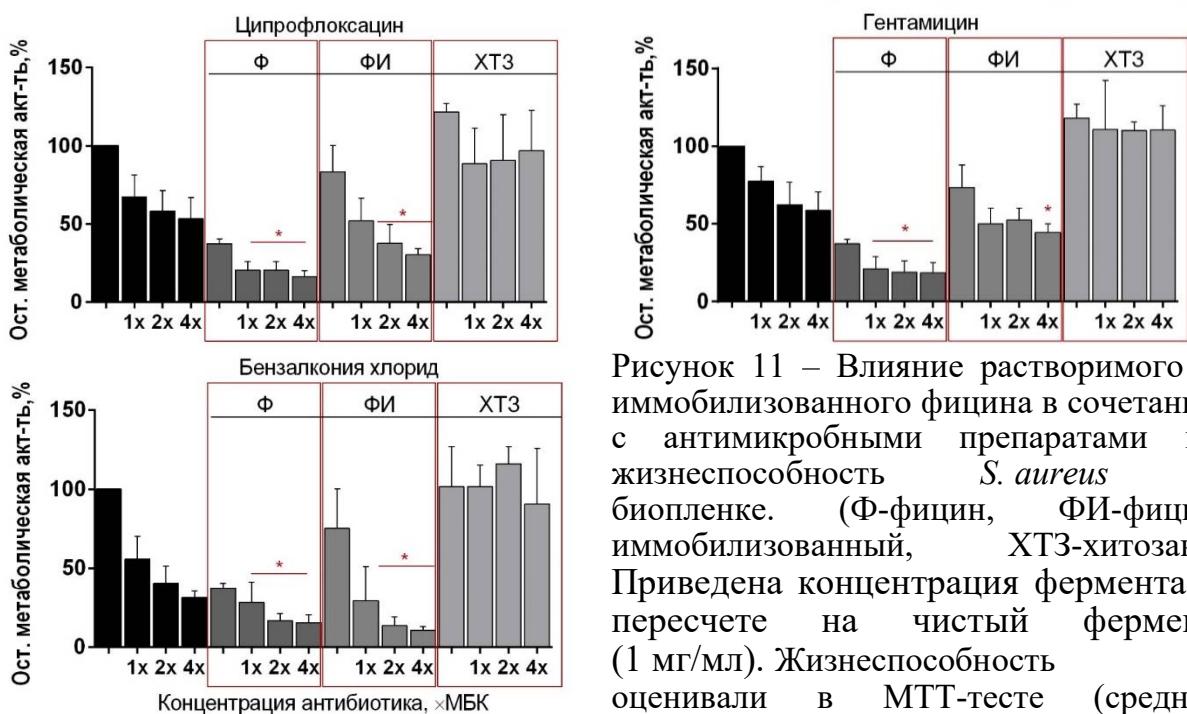
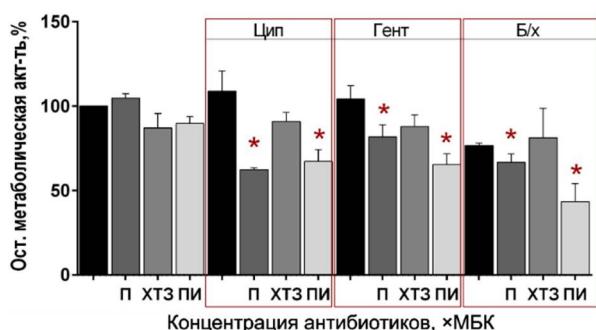


Рисунок 11 – Влияние растворимого и иммобилизованного фицина в сочетании с антимикробными препаратами на жизнеспособность *S. aureus* в биопленке. (Ф-фицин, ФИ-фицин иммобилизованный, ХТЗ-хитозан). Приведена концентрация фермента в пересчете на чистый фермент (1 мг/мл). Жизнеспособность оценивали в МТТ-тесте (среднее значение \pm СКО). Достоверность оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса. * $p<0.05$



Цип-ципрофлоксацин, Гент-гентамицин, Б/х-бензалкония хлорид в концентрации 8×МБК

Рисунок 12 – Влияние растворимого и иммобилизованного папаина в сочетании с антимикробными препаратами на жизнеспособность *S. aureus* в биопленке. (П-папаин, ХТЗ-хитозан, ПИ-папаин иммобилизованный). Приведена концентрация фермента в пересчете на чистый фермент (1 мг/мл). Жизнеспособность оценивали в МТТ-тесте (среднее значение ± СКО). Достоверность оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса. * $p<0.05$

4 Влияние ферментов, хитозана и иммобилизованного на хитозане фицина на ранозаживление и восстановление структуры тканей

Повышение эффективности и ускорение заживления как хронических, так и острых ран, ожогов остается важной задачей клинической медицины. Протеолитические ферменты являются эффективными инструментами для восстановления тканей, поскольку они разрушают поврежденные клетки, некротический материал, медиаторы и токсические продукты, тем самым уменьшая время заживления ран, отек и боль [Shah *et al.*, 2018].

Для того, чтобы оценить способность растворимого и иммобилизованного фицина ускорять закрытие и микробную деконтаминацию инфицированных кожных ран у крыс, раны обрабатывали ежедневно растворами ферментных препаратов с концентрацией 1 мг/мл в пересчете на чистый белок. В качестве препарата сравнения использовали химотрипсин. Чистый хитозан был использован в качестве негативного контроля. Контролем без лечения служила обработка 0.9% раствором NaCl.

Полученные данные свидетельствуют, что скорость закрытия ран была одинаковой для всех вариантов лечения (Рисунок 13А), обе формы фицина при местном применении обеспечивали снижение количества клеток *S. aureus* на поверхности ран на 3 порядка через 6 дней, тогда как для достижения такого же результата в ранах, обработанных химотрипсином требовалось не менее 10 дней (Рисунок 13Б).

При анализе направленности коллагена на 15-й день лечения, значения удлинения тензора при обработке обоими формами фицина (в концентрации 1 мг/мл в пересчете на чистый белок) были близки к 1.0, что соответствует хаотичному расположению волокон и характерно для нативной структуры соединительной ткани (Рисунок 14А). Что касается плотности коллагена, результаты были ближе к характеристикам нативной ткани в ранах только при обработке иммобилизованным фицином, в то время как обработка растворимым фицином, химотрипсином и хитозаном приводила к характеристикам даже хуже, чем в контроле (Рисунок 14Б).

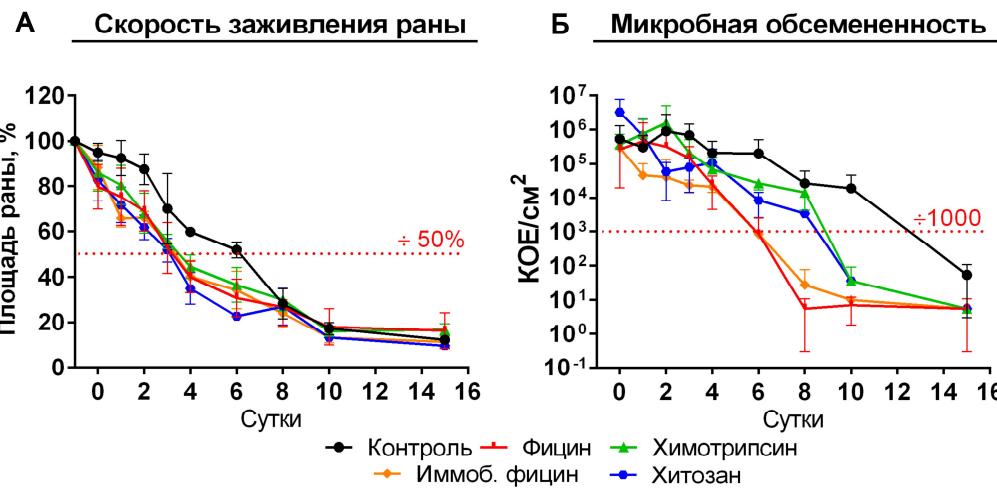


Рисунок 13 – Влияние разных вариантов обработки на заживление и микробное очищение ран, инфицированных стафилококками. Ферментные препараты применялись в концентрации 1 мг/мл в пересчете на чистый белок. Для КОЕ приведены медиана ± интерквартильный размах.

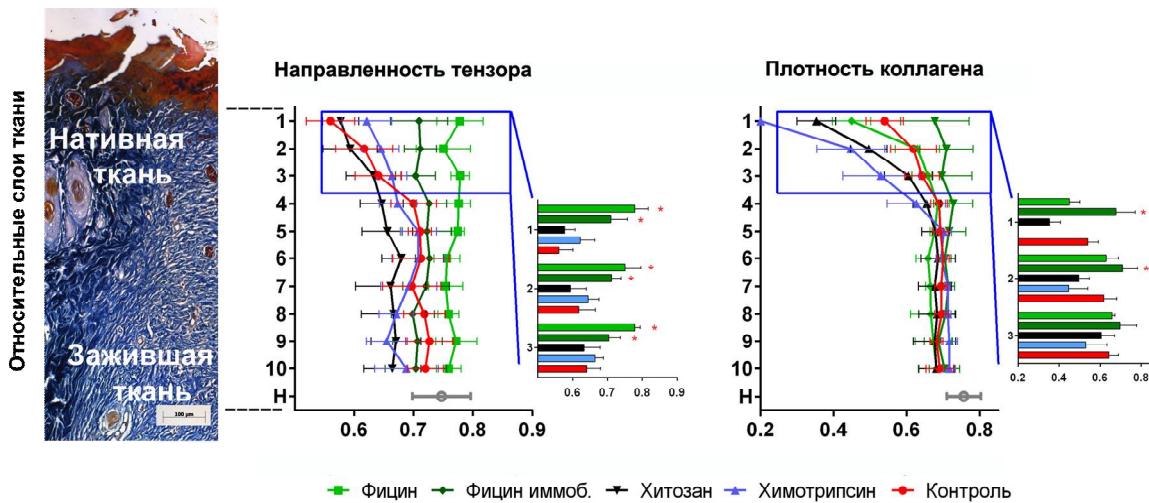


Рисунок 14 – Оценка тензора удлинения коллагена (А) и плотности коллагена (Б) на гистологических срезах тканей из инфицированных ран, необработанных (контроль) или подвергнутых различным сценариям обработки, включая растворимый фицин (1 мг/мл), иммобилизованный фицин (75 мг/мл), хитозан (75 мг/мл) и химотрипсин (1 мг/мл). Приведены среднее значение ± стандартное отклонение. Достоверность оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса.
* $p < 0.05$

Та же модель инфицированной кожной раны, что и в предыдущих экспериментах, была использована для изучения потенциала растворимого фицина (1 мг/мл) повышать эффективность антимикробных препаратов.

При совместном применении фицина с гентамицином или ципрофлоксацином уже через 2 дня лечения наблюдалось снижение количества КОЕ в ранах на 3 порядка по сравнению с применением только антимикробных препаратов (Рисунок 15). Подобный эффект можно было ожидать при сочетании иммобилизованного фицина с антимикробными препаратами, предполагая десорбцию фермента с носителя.

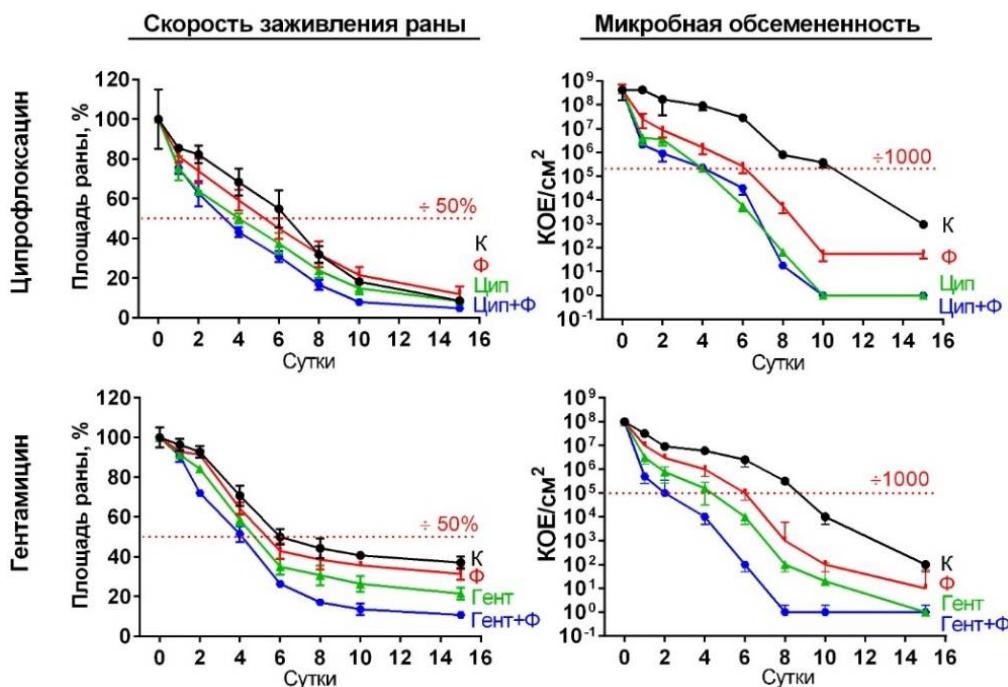


Рисунок 15 – Влияние сочетанного применения фицина (1 мг/мл) с антибактериальными препаратами (8×МБК) на заживление ран и эффективность антимикробной терапии инфицированных кожных ран (К-контроль, Ф-фицин, Цип-ципрофлоксацин, Гент-гентамицин). Для КОЕ приведены медиана ± интерквартильный размах.

В целом наши данные свидетельствуют о том, что фицин представляет значительный интерес в качестве ранозаживляющего и антибиопленочного агента. Обратимая иммобилизация фицина на хитозане и его медленная десорбция, по всей видимости, облегчает непрерывное лечение ран малыми дозами фермента, что приводит к восстановлению ткани, одновременно снижая потери от аутопротеолиза. Примечательно, что при этом свойства восстановленных тканей выглядят ближе к интактным образцам тканей по сравнению с альтернативными вариантами лечения. Наблюдаемые эффекты и стабильность иммобилизованного на хитозане фицина позволяют предложить его добавление в перевязочные материалы для ускорения заживления ран путем предотвращения их биообрастания и повышения эффективности антимикробного лечения инфицированных ран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе полученных данных установлено, что протеолитические ферменты фицин и папаин, а также препарат Лонгидаза® способны разрушать матрикс стафилококковых биопленок и за счет этого повышать эффективность антимикробных препаратов. Хотя препарат Лонгидаза® в сочетанном действии с антибиотиками показал менее выраженный эффект, данный препарат с наибольшей эффективностью способен разрушать смешанные бактериальные биопленки. Иммобилизованные на хитозане фицин и папаин также проявили эффективность против стафилококковых биопленок как отдельно, так и в комплексе с антибиотиками, но в меньшей степени по сравнению с растворимыми формами. Однако, иммобилизованная и растворимая формы фицина способны повышать скорость заживления и очищения раны, как отдельно, так и в сочетании с антибактериальными средствами. Фицин может способствовать заживлению тканей до полного восстановления структуры коллагена, что касается иммобилизованной формы, то плотность коллагена в верхних слоях образцов была аналогична нативной ткани, что свидетельствует о том, что значительно улучшается восстановление тканей, а также облегчается реепителизация, что дает возможность использовать данный ферментный препарат для лечения наружных ран.

Полученные результаты приводят к следующим **выводам**:

- 1) Среди 8 исследованных коммерчески доступных ферментов, папаин, фицин и препарат Лонгидаза® являются наиболее эффективными деструкторами внеклеточного матрикса биопленок *S. aureus*. В концентрации 1000 мкг/мл фицин приводит к снижению биомассы биопленки до 40%, папаин – до 65%. Лонгидаза® в концентрации 750 МЕ/мл снижает биомассу биопленок стафилококков до 60%.
- 2) Эффективная концентрация антимикробных препаратов против клеток в составе биопленки в сочетании с ферментами снижается в 2 раза.
- 3) Иммобилизованные на хитозане фицин и папаин характеризуются большей стабильностью, но эффективность в деструкции биопленок снижается в 2-4 раза. При этом эффект потенцирования антибиотиков против стафилококковых биопленок при сочетании с иммобилизованными ферментами сохраняется.
- 4) Фицин в растворимой и иммобилизованной формах повышает скорость заживления и очищения раны при применении как отдельно, так и в комплексе с антибактериальными средствами. При этом применение иммобилизованного на хитозане фицина приводит к формированию структуры коллагена, близкого по плотности и дисперсии тензора к нативной ткани.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень (ВАК):

1. **Байдамшина Д.Р.** Оценка генотоксичности и цитотоксичности препаратов иммобилизованного на матрице хитозана трипсина [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка, О.О. Логинова, С.М. Сазыкина, В.Г. Артюхов, А.Р. Каюмов // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. – №3. - С.53-57.

Научные статьи в отечественных изданиях, которые входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования (ВАК, Scopus / Web of Science):

2. Тризна Е.Ю. Влияние *in vitro* изолированного и сочетанного с антибактериальными средствами применения бовгидалуронидазы азоксимер на целостность бактериальной биопленки и жизнеспособность микроорганизмов [Текст] / Е.Ю. Тризна, **Д.Р. Байдамшина**, А.А. Виницкий, А.Р. Каюмов // Экспериментальная и клиническая фармакология / Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. – 2020. – Т.83, №2. - С. 38-44.

3. Тризна Е.Ю. Растворимые и иммобилизованные папаин и трипсин-деструкторы бактериальных биопленок [Текст] / Е.Ю. Тризна, **Д.Р. Байдамшина**, М.Г. Холявка, И.С. Шарафутдинов, А.Р. Хайрутдинова, Ф.А. Хафизова, Е.Ю. Закирова, Р.Г. Хафизов, М.И. Богачев, А.Р. Каюмов // Гены и клетки / Genes and Cells. – 2015. – Т.10. №.3. – С.106-112.

Научные статьи в зарубежных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus/ Web of Science:

4. **Baidamshina D.R.** Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain [Text] / D.R. Baidamshina, V.A. Koroleva, S.S. Olshannikova, E.Y. Trizna, M.I. Bogachev, V.G. Artyukhov, M.G. Holyavka, A.R. Kayumov // Marine Drugs. – 2021. – V.19..

5. Trizna E. Improving the Efficacy of Antimicrobials against Biofilm-Embedded Bacteria Using Bovine Hyaluronidase Azoximer (Longidaza®) [Text] / E. Trizna, **D. Baidamshina**, A. Gorshkova, V. Drucker, M. Bogachev, A. Tikhonov, A. Kayumov // Pharmaceutics. – 2021. – V.13.

6. **Baidamshina D.R.** Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin [Text] / D.R. Baidamshina, V.A. Koroleva, E.Y. Trizna, S.M. Pankova, M.N. Agafonova, M.N. Chirkova, O.S. Vasileva, N. Akhmetov, V.V. Shubina, A.G. Porfiryev, E.V. Semenova, O.A. Sachenkov, M.I. Bogachev, V.G. Artyukhov, T.V. Baltina, M.G. Holyavka, A R. Kayumov // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V.164. - P. 4205-4217.

7. **Baidamshina D.R.** Targeting microbial biofilms using Ficin, a non-specific plant protease [Text] / D.R. Baidamshina, E.Y. Trizna, M.G. Holyavka, M.I. Bogachev, V.G. Artyukhov, F.S. Akhatova, E.V. Rozhina, R.F. Fakhrullin, A.R. Kayumov // Scientific reports. – 2017. – V.7.

Тезисы докладов в научных изданиях, входящих в базы цитирования Scopus и Web of Science

8. **Baidamshina D.** The effect of bovgialuronidase azoximer (Longidaza (R)) on antibiotics susceptibility of biofilm-embedded bacteria in vitro [Text] / D. Baidamshina, E. Trizna, A. Vinitskiy, L. Chernova, A. Kayumov // European Journal of Clinical Investigation. – 2020. – V.50 (1). SI. Аннотация к встрече: 54ASM-0344. – P.73.

9. **Baidamshina D.** Automatic processing and quantification of histological images [Text] / D. Baidamshina, E. Semenova, O. Sachenkov, T. Baltina, R. Zamaliev, A. Kayumov // FEBS Open Bio. – 2019. – V.9 (1). Аннотация к встрече: P-33-003. - P.312-313.

10. **Baidamshina D.** The effect of ficin, a non-specific plant protease, on staphylococcal biofilms disruption [Text] / D. Baidamshina, E. Trizna, F. Akhatova, M. Holyavka, E. Rozhina, R. Fakhrullin, M. Bogachev, A. Kayumov // FEBS Journal. – 2016. – V.283 (1). SI. Аннотация к встрече: P02075-023.

Научные монографии:

11. Биопленки как фактор патогенности *Staphylococcus aureus*: подходы к терапии: монография / Каюмов А.Р., Тризна Е.Ю., Шарафутдинов И.С., **Байдамшина Д.Р.**, Рыжикова М.Н.; под общ. ред. А.Р. Каюмова. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – 124 с.

Публикации в иных научных изданиях:

12. **Байдамшина Д.Р.** Использование гидролитических ферментов для повышения эффективности терапии инфекций, ассоциированных с образованием бактериальной биопленки [Текст] / Д.Р. Байдамшина, М.Г. Холявка, Е.Ю. Тризна, В.А. Королева, С.М. Ольшанникова, А.Р. Каюмов // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы международного конгресса, Москва, 26-29 октября 2021 г. Вып. 19. – Москва: ООО «Экспо-биохим-технологии», 2021. – С.82-84.

13. **Байдамшина Д.Р.** Антибиопленочная и ранозаживляющая активность иммобилизованного на хитозане фицина [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка, М.Н. Агафонова, М.Н. Чиркова, О.С. Васильева, А.Р. Каюмов // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых, посвященной памяти проф. А.П. Веселова (Н.Новгород, 20–23 апреля 2021 г.). – Нижний Новгород: Университет Лобачевского. 2021. – С.19.

14. **Байдамшина Д.Р.** Ранозаживляющая активность растворимого и иммобилизованного на хитозане фицина [Текст] / Д.Р. Байдамшина, М.Г. Холявка, М.Н. Агафонова, О.А. Саченков, А.Р. Каюмов // Сборник Тезисов IV Всероссийской с международным участием школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 8-10 ноября 2021 г.) / отв. ред. А.В. Герасимов. – Казань: КФУ, 2021. – С.10.

15. **Байдамшина Д.Р.** Антимикробная и ранозаживляющая активность хитозан-иммобилизованного фицина [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов / Актуальная биотехнология. - 2020. - №3 (34). - С.282-284.

16. **Байдамшина Д.Р.** Повышение эффективности антимикробных препаратов в комплексе с ферментативной обработкой бактериальных биопленок [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов / Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Н.Новгород, 28–30 октября 2020 г.). – Нижний Новгород: Университет Лобачевского, 2020. – С. 24.

17. **Байдамшина Д.Р.** Ускорение микробной деконтаминации и ранозаживления при использовании фицина [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, Н.Ф. Ахметов, Т.В. Балтина, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Н.Новгород, 23–26 апреля 2019 г.). – Нижний Новгород: Университет Лобачевского, 2019. – С.36.

18. **Байдамшина Д.Р.** Сравнительная оценка потенциала растворимых и иммобилизованных ферментов для разрушения бактериальных биопленок [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2019 (Кольцово, 22-25 октября 2019 г.): сборник тезисов. – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2019. - С. 22-25.

19. **Байдамшина Д.Р.** Использование фицина для ускорения микробной деконтаминации и ранозаживления [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, Н.Ф. Ахметов, Т.В. Балтина, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов // В поисках моделей персонализированной медицины. Сборник научных трудов V Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2018», 29 октября – 2 ноября 2018 г., Казань. – Казань: Издательство Казан. ун-та. 2018. – С.210.

20. **Байдамшина Д.Р.** Фицин - деструктор микробных биопленок [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна // Наука будущего - наука молодых: сборник тезисов участников форума (20 - 23 сентября 2016 г., г. Казань). Т.2. – Казань: Инконсалт К, 2016. – С.22-25.

21. **Байдамшина Д.Р.** Иммобилизованный фицин – деструктор микробных биопленок [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов // Биология наука XXI века: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. – Пущино, 2015. – С.160. (0.13 п.л., авт. 0.04 п.л.)
22. **Байдамшина Д.Р.** Иммобилизованный фицин - деструктор микробных биопленок [Текст] / Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов // Сборник тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 25–28 ноября 2015 г.) / отв. ред. А.В. Герасимов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2015. – С. 24.
23. **Байдамшина Д.Р.** Оценка мутагенных и цитотоксических свойств иммобилизованных на хитозане ферментов для применения в качестве ранозаживляющих препаратов [Текст] / Д.Р. Байдамшина, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов // Биология наука XXI века: 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21-25 апреля 2014 г.). Сборник тезисов. – Пущино, 2014. – С. 62-63.
24. **Байдамшина Д.Р.** Оценка мутагенных и цитотоксических свойств иммобилизованных на хитозане ферментов для применения в качестве ранозаживляющих препаратов [Текст] / Д.Р. Байдамшина, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (11-12 декабря 2014 г., Казань) / Отв. ред. А.В. Герасимов. – Казань: Изд-во КФУ, 2014. – С.13.
25. **Байдамшина Д.Р.** Оценка мутагенных и цитотоксических свойств иммобилизованных на хитозане ферментов для применения в качестве ранозаживляющих препаратов [Текст] / Д.Р. Байдамшина, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: сборник трудов IV международной научно-практической конференции (Казань, 29 октября – 1 ноября 2014 г.). – Казань, 2014. – С.284.

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю диссертационного совета КФУ.015.2 к.б.н., доценту Кравцовой Ольге Александровне, e-mail: okravz@yandex.ru

E-mail автора: dianabaidamshina@yandex.ru