

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Имени М.В. Ломоносова
УНИВЕРСИТЕТ РУАНА**

На правах рукописи

ГАННЕСЕН АНДРЕЙ ВЛАДИСЛАВОВИЧ

**СТРУКТУРА И СОСТАВ МОНО- И МУЛЬТИВИДОВЫХ БИОПЛЕНОК
МИКРООРГАНИЗМОВ КОЖИ И ПРИРОДНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ:
ДЕЙСТВИЕ НА НИХ КОСМЕТИКИ И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

**Москва
2018**

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и в Лаборатории микробиологии, сигналов и микроокружения LMSM EA4312 Университета Руана, Франция.

Научные руководители: **Нетрусов Александр Иванович,**
доктор биологических наук, профессор, заведующий
кафедрой микробиологии биологического факультета
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»

Фейоле Марк Жорж Жуйен,
Ph.D., профессор, директор Лаборатории
микробиологии, сигналов и микроокружения LMSM
EA4312 Университета Руана

**Официальные
оппоненты:** **Яненко Александр Степанович,**
доктор биологических наук, профессор, директор
НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика
Градова Нина Борисовна,
доктор биологических наук, профессор кафедры
биотехнологии ФГБОУ ВО РХТУ имени Д.И. Менделеева
Плюта Владимир Александрович,
кандидат биологических наук, научный сотрудник
лаборатории регуляции экспрессии генов
микроорганизмов ИМГ РАН

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 года в __ ч __ мин на заседании диссертационного совета МГУ.03.08 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.12, биологический факультет, аудитория М-1. Тел.: 8 (495) 939-54-83; электронная почта: npiskunkova@rambler.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета, к.б.н.

Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Здоровье кожи и состояние ее микробиоты тесно связаны. Повреждения и болезни кожи (физические травмы, а также атопический дерматит, псориаз и другие нарушения в работе иммунной системы) вызывают изменение видового соотношения микроорганизмов кожи (SanMiguel, Grice, 2015). Это приводит к осложнениям (размножению патогенных микробов, воспалению и т.д. (Hong et al., 2011)). Лекарственные препараты и косметические средства представляют собой экзогенные химические факторы, которые напрямую воздействуют на представителей микробиоты кожи (Schlievert, Peterson, 2012; Hess et al., 2015; Trompezinski et al., 2016; Eroshenko et al., 2017) и способны изменять баланс в микробном сообществе (Eroshenko et al., 2017), что может приводить к ухудшению состояния кожи и здоровья человека. Поэтому исследования влияния биологически активных соединений на сообщество микроорганизмов кожи актуальны и проводятся во всем мире. Однако, если влияние антибиотиков изучается очень активно, исследованиям соединений, не обладающих прямым антимикробным действиям, посвящается немного работ. Помимо изучения воздействия активных соединений на микроорганизмы, непосредственно ассоциированные с кожей человека, необходимо исследовать их влияние на близкие к кожным микроорганизмам штаммы, живущие в других, природных местообитаниях, но способные колонизировать кожу, что иногда приводит к серьезным последствиям (как в случае, с почвенным микроорганизмом *Pseudomonas putida*, близким к патогенному *Pseudomonas aeruginosa*, Molino et al., 2014; Hardjo Lugito et al., 2015).

Микроорганизмы на коже могут подвергаться воздействию не только экзогенных для человека, но и его эндогенных биологически активных соединений, причем не только традиционно считающихся антибактериальными, но и не обладающих прямым антибактериальным действием. Микроорганизмы в организме человека могут постоянно подвергаться действию упомянутых продуктов, поэтому, учитывая малую степень изученности данной области, работа по исследованию влияния эндогенных факторов человека на его микробиоту крайне актуальна.

Микроорганизмы в природе существуют преимущественно в виде структурированных сообществ, погруженных во внеклеточный матрикс – мультивидовых биопленок (Николаев, Плакунов, 2007; Ножевникова с соавт., 2015). В организме человека микроорганизмы также живут преимущественно в виде мультивидовых биопленок и особенно на коже, где физико-химические

параметры среды не позволяют развиваться планктонной культуре (совокупности одиночных свободных клеток). Биопленки микроорганизмов отличаются от планктонных культур целым рядом параметров, в первую очередь – повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды и биоцидам, и их внеклеточный матрикс является одним из факторов устойчивости. Поэтому исследование состава матрикса биопленок важно для фундаментальной науки и для прикладных областей знания: например, для разработки потенциальных антибиопленочных препаратов, способных проникать сквозь барьер матрикса и достигать микробных клеток. Биопленки патогенов, развивающиеся в организме человека, являются причиной более 60% всех хронических инфекций (Николаев, Плакунов, 2007), что делает необходимым исследования процессов их формирования и влияния на них разнообразных активных соединений и, в первую очередь, биоцидов.

В настоящее время ежегодно публикуется множество работ, посвященных моновидовым биопленкам, однако, исследования даже простейших мультивидовых систем - бинарных биопленок, очень малочисленны (Tyner, Patel, 2016; Vandecandelaere et al., 2017; Eroshenko et al., 2017). При этом воздействию биологически активных соединений на бинарные биопленки микроорганизмов кожи человека посвящены лишь единичные работы (Kong et al., 2016; Kong et al., 2017; Eroshenko et al., 2017), что делает актуальным дальнейшее исследование этих объектов.

Целью работы являлось исследовать ряд типичных представителей микробиома кожи и близких к ним микроорганизмов: влияние на них биологически активных соединений разной природы, формирование этими микроорганизмами моновидовых и бинарных биопленок, изучение возможных механизмов действия испытываемых соединений, а также исследование биохимического состава матрикса биопленок кожного акнеического штамма *Cutibacterium acnes* RT5.

Задачи:

1) Исследовать влияние антибиотика азитромицина, широко применяющегося в лечении инфекций, вызываемых псевдомонадами, на рост культур и биопленок *Pseudomonas chlororaphis* – непатогенного микроорганизма, близкого к обитающему на коже патогену *Pseudomonas aeruginosa*.

2) Исследовать действие антигельминтного препарата никлозамида на рост культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека *Micrococcus*

luteus, *Kytococcus schroetrii* и *Staphylococcus aureus*. Проверить способность никлозамида усиливать действие азитромицина.

3) Исследовать влияние компонентов косметики Термальной воды Уриаж™ (ТВУ) и олигосахарида PS291® (тефлозы) на рост моновидовых и бинарных планктонных культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека *S. aureus*, *S. epidermidis* и акнеических штаммов *C. acnes*.

4) Исследовать влияние натрийуретических пептидов (НУП) А- и С-типов на рост моновидовых и бинарных планктонных культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека *S. aureus*, *S. epidermidis* и акнеических штаммов *C. acnes*.

5) Исследовать биохимический состав матрикса биопленок акнеического штамма *C. acnes* RT5 различными методами.

Научная новизна исследований

Впервые показано, что антибиотик азитромицин в субингибиторных концентрациях стимулирует рост биопленок *P. chlororaphis*, и что в этом процессе участвует ацилгомосеринлактон (АГЛ) - зависимая система кворум-сенсинга (QS). Впервые показан необычный характер воздействия азитромицина на рост биопленок *P. chlororaphis*: стимуляция роста биопленок происходит при относительно высоких концентрациях, тогда как ингибирование наблюдается при наличии в среде концентраций на несколько порядков меньше МИК. Показано, что стимулированные антибиотиком биопленки обладают повышенным количеством полисахаридного компонента матрикса, а также более устойчивы к тепловому шоку.

Показан выраженный ингибирующий эффект никлозамида на рост планктонных культур и биопленок *S. aureus*, *M. luteus* и *K. schroeteri*. Обнаружено, что никлозамид снимает эффект стимуляции роста биопленок *S. aureus* субингибиторными концентрациями азитромицина, что делает его перспективным антибиопленочным агентом.

Показано, что ТВУ™ и PS291® значительно подавляют рост биопленок *S. aureus* и *C. acnes*, не проявляя при этом токсического эффекта (в отношении...). Вероятно, данные соединения модифицируют способность бактериальных клеток к адгезии, что делает перспективным создание на их основе новых косметических препаратов. Оба эти соединения обладают регуляторным эффектом и смещают баланс численности бактерий в бинарной биопленке *S. aureus* и *S. epidermidis* в сторону *S. epidermidis*, что благоприятно для состояния кожи, т.к. золотистый стафилококк гораздо опаснее, чем *S. epidermidis*. Аналогичным образом, в

бинарной биопленке *S. aureus* и *C. acnes* в присутствии исследованных соединений баланс сдвигается в сторону *C. acnes*.

Впервые показано, что НУП человека оказывают сильное влияние на рост биопленок грамположительных микроорганизмов микробиоты кожи человека. Установлено, что их эффект в отношении биопленок *S. aureus*, *S. epidermidis* и *C. acnes* зависит от условий культивирования, что может определять специфику их влияния на формирование биопленок при различных физиологических состояниях кожи. Показано, что НУП способны регулировать состав бинарных биопленок комменсалов кожи: усиливать конкурентные преимущества *S. epidermidis* и *C. acnes* перед *S. aureus*, что предполагает совместную эволюцию микробиоты кожи и регуляторных молекул-метаболитов человека. Это делает НУП перспективными для применения в косметологии и дерматологии для нормализации баланса микробиоты кожи.

Впервые исследовано соотношение биохимических компонентов матрикса биопленок *C. acnes*. Показано, что доминирующими компонентами матрикса биопленок *C. acnes* являются полисахариды. Впервые проведено детальное исследование тотального протеома матрикса биопленок *C. acnes*, выявлены белки-компоненты матрикса, предположены их роли в матриксе. Впервые проведено исследование матрикса *C. acnes* с помощью SERS-спектроскопии и получены профили SERS-спектров клеток бактерий в биопленках и матрикса биопленок *C. acnes*.

Практическая значимость работы

Показана универсальность явления стимуляции роста биопленок субингибиторными концентрациями антибиотика азитромицина, который стимулирует рост не только биопленок патогенов человека, но и почвенных сапротрофов. Показана вовлеченность системы QS у *P. chlororaphis* в стимуляцию роста биопленок азитромицином, что подтверждает перспективность подавления ее работы для снятия эффекта стимуляции. Показано, что стимуляция азитромицином приводит к более интенсивному синтезу полисахаридов матрикса. Установлено, что матрикс биопленок играет значительную роль в устойчивости их к тепловому шоку, и биопленки *P. chlororaphis*, сформированные при стимулирующей концентрации азитромицина, в условиях теплового шока растут лучше, чем сформированные в отсутствие антибиотика (что может использоваться при их биотехнологическом применении). Показана перспективность нетоксичного для человека в антибиопленочных концентрациях никлозамида для борьбы с биопленками грамположительных микроорганизмов, а

также его способность снимать эффект стимуляции роста биопленок азитромицином у *S. aureus*, что делает никлозамид перспективным компонентом бинарных антибиопленочных препаратов.

Показана перспективность создания новых косметических средств с модулирующим микробиоту человека действием на основе ТВУ™ и PS291® для борьбы с *C. acnes* и *S. aureus* на коже человека.

Показана перспективность применения НУП в антибактериальной терапии, а также обнаружено новое свойство НУП, а именно, способность регулировать состав микробиоты кожи, что открывает большие перспективы в эндокринологии и клинической практике.

Разработана методика выделения матрикса биопленок грамположительных бактерий, позволяющая изолировать матрикс без применения специальных химических агентов, что сохраняет нативный состав матрикса. Показано присутствие разнообразных белков в матриксе *C. acnes*, что создает перспективы для исследования их роли в патогенезе инфекций, вызываемых *C. acnes*.

Личный вклад автора. Диссертационная работа – результат исследований соискателя в период с 2014 по 2018 годы. Личный вклад автора заключается в работе с литературными источниками и проведении экспериментальных исследований, результаты которых получены исключительно самим автором или при его определяющем или непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. Участие соавторов соискателя и организаций, в которых они работают, обозначено в тексте работы во всех случаях.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы доложены на 11 научных мероприятиях: на III Всероссийской научно-практической конференции «Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле» (Листвянка, Иркутская область, 2014), на XXVII Зимней молодежной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2015), на VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), на XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015" (Москва, 2015), на X Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2015), на Международном конгрессе “Cosminnov” (Париж, Франция, 2016), на международном конгрессе «Antimicrobial resistance in microbial biofilms and

options for the treatment» (Гент, Бельгия, 2016), на XI Международной школе-конференции с международным участием "Актуальные аспекты современной микробиологии" (Москва, 2016), на XXIX Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2017), на 21 Международной пушинской школе-конференции молодых учёных "Биология - наука 21 века" (Пушино, 2017), на 9 Международном конгрессе «Skin Ageing and Challenges» (Порту, Португалия).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 6 – статьи в рецензируемых журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science, 3 из них – в журналах, входящих также в ядро РИНЦ (RSCI), 11 – тезисы докладов на всероссийских и международных научных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из, введения, обзора литературы, экспериментальной части (разделы «материалы и методы», «результаты исследования и их обсуждение», «заклучение»), выводов, списка литературы, приложения. Материал изложен на 227 страницах машинописного текста (из них 181 стр. занимает диссертация и 46 – приложение), содержит 13 таблиц и 46 рисунков. Список литературы включает 437 источников, в том числе 417 работ иностранных авторов.

Благодарности. Автор глубоко благодарен своим научным руководителям: доктору философии, профессору, директору Лаборатории микробиологии, сигналов и микроокружения LMSM EA4312 Марку Жоржу Жуйену Фейоле, доктору биологических наук, профессору и заведующему кафедрой микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова Александру Ивановичу Нетрусову. Особую, отдельную благодарность автор выражает научному консультанту, доктору биологических наук, профессору главному научному сотруднику лаборатории нефтяной микробиологии ИНМИ им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН Владимиру Константиновичу Плакунову за обучение работе, ценные комментарии, помощь в организации работы и моральную поддержку.

Автор благодарен коллегам из лаборатории нефтяной микробиологии, коллективу кафедры микробиологии, коллективу Лаборатории микробиологии, сигналов и микроокружения LMSM EA4312 Университета Руана за помощь в работе, ценные советы и моральную поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре проанализированы данные, касающиеся закономерностей формирования микробных биопленок, метаболических особенностей биопленочных микроорганизмов, значения биопленок для медицины и биотехнологии. Рассмотрена микробиота кожи и конкретные ее представители, исследованные в настоящей работе, их значение и взаимодействие с организмом человека. Приведены данные о моновидовых и бинарных биопленках микроорганизмов, использованных в качестве объектов настоящей работы, о действии на них биологически активных соединений: компонентов косметики, антибиотиков и других лекарственных препаратов, а также эндогенных факторов человека, не обладающих прямым антимикробным действием. Обсуждаются структура и состав матрикса биопленок ряда представителей микробиоты кожи, его свойства и важность для биопленочных микроорганизмов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – микроорганизмы-представители микробиоты кожи человека *Staphylococcus aureus* MFP03 и 209P, *Staphylococcus epidermidis* MFP04, *Cutibacterium acnes* RT4 и RT5, *Micrococcus luteus* S01, *Kytococcus schroeteri* N01, близкий к кожным микроорганизмам из рода *Pseudomonas* – *P. chlororaphis* 449 и его трансформированные варианты с мутациями в генах разных сигнальных систем; а также биологически активные соединения: антибиотик азитромицин, антигельминтный препарат никлозамид с потенциальной антимикробной активностью, косметические средства и их компоненты Термальная вода Уриаж™ (ТВУ) и олигосахарид PS291® или тефлоза, натрийуретические пептиды (НУП) человека А- и С-типов.

Исследования действия антибиотика азитромицина на рост *P. chlororaphis* 449 и его трансформированных вариантов производили при помощи оригинальной методики выращивания биопленок на тефлоновых кубиках в жидкой среде LB с последующей окраской кристаллическим фиолетовым (КФ) и определением оптической плотности экстрактов красителя (Стрелкова с соавт., 2012). Для исследования механизма стимуляции роста биопленок субингибиторными концентрациями азитромицина, использовали штаммы *P. chlororaphis* с мутациями в генах разных сигнальных систем и разной способностью к синтезу ацилгомосеринлактонов (АГЛ) и, как следствие, с разным

уровнем работы системы чувства кворума или Quorum sensing (QS). Использовали следующие штаммы: 1) с мутацией в гене *rpoS* (синтезирует АГЛ); с мутацией в гене *gacS* (синтез АГЛ снижен); с мутацией в гене *phzB* (синтезирует АГЛ); с мутацией в гене *phzA* (синтезирует АГЛ); содержащий плазмиду pME6863, включающую клонированный ген *aiiA* (ацилгомосеринлактоназы) и ген устойчивости к тетрациклину (синтез АГЛ отсутствует). Для выяснения, какой из компонентов биопленки *P. chlororaphis* (клетки бактерий или матрикс) стимулируется или ингибируется азитромицином, использовали **метод окрашивания биопленок при помощи красителя диметилметиленового синего** – красителя, преимущественно окрашивающего кислые полисахариды матрикса, а также **метод эпифлуоресцентной микроскопии** биопленок, выращенных на предметных стеклах и окрашенных специфичным к белкам красителем SYPRO Ruby и универсальным красителем DAPI.

Исследование воздействия никлозамида на биопленки производили при помощи оригинального **метода выращивания биопленок на стекловолоконных фильтрах с последующей окраской метаболизируемым красителем 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ)** (Плакунов с соавт., 2016). МТТ выступает в качестве акцептора электронов от НАДН-дегидрогеназ в электротранспортных цепях микроорганизмов; восстанавливаясь, он превращается в нерастворимый синий формазан, количество которого пропорционально количеству метаболически активных клеток в биопленке (Плакунов с соавт., 2016). Формазан экстрагировали диметилсульфоксидом и измеряли оптическую плотность экстрактов при длине волны 590-600 нм. Для проверки способности никлозамида устранять эффект стимуляции роста биопленок антибиотиками, использовали сочетание азитромицина и никлозамида в субингибиторных концентрациях в опытах с *S. aureus*. Методом окраски МТТ также исследовали влияние косметических средств и НУП на биопленки микроорганизмов-комменсалов кожи.

Исследование влияния косметических средств ТВУ и PS291® и НУП на **кинетику роста** культур *S. aureus* MFP03, *S. epidermidis* MFP04 и штаммов *C. acnes* производили в системах Bioscreen C и в системе SAFAS в иммунологических планшетах. В лунки вносили необходимую для конкретного микроорганизма среду и исследуемые соединения в нужных концентрациях. Часть лунок служила положительным контролем (без добавления исследуемых

соединений), а часть - оставляли незасеянными в качестве холостых вариантов. В случае компонентов косметики планшеты инкубировали при 37°C в соответствующей атмосфере (для стафилококков – аэробная, для *S. acnes* – анаэробная). В случае НУП варьировали температуру (37°C или 33.5°C), имитируя разные состояния кожи. При этом параллельно исследовали влияние биологически активных веществ на рост биопленок при помощи классического **метода выращивания биопленок в иммунологических планшетах** с последующей окраской КФ. Кратко – биопленки выращивали в лунках планшетов в жидкой среде, затем жидкость удаляли, биопленки промывали, фиксировали, окрашивали КФ и затем измеряли ОП₅₉₀ экстрактов КФ в 96% этаноле.

Изменение свойств поверхности клеток *S. aureus* MFP03 и *S. acnes* в присутствии косметических средств исследовали при помощи **метода адгезии микроорганизмов к растворителям** (microbial adhesion to solvents – MATS). Моновидовые бактериальные культуры, выращенные в присутствии тестируемых веществ, осаждали, отмывали стерильным ФР и ресуспендировали в ФР до конечной ОП₄₀₀ = 0.8. Далее суспензии клеток смешивали с полярными (хлороформ и этилацетат) и неполярными (декан и гексадекан) органическими растворителями, после чего анализировали ОП₄₀₀ водной фазы. Сравнением сродства клеток к тем или иным растворителям оценивали изменение гидрофобности и заряда поверхности клеток.

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию моновидовых биопленок *S. aureus* MFP03, *S. epidermidis* MFP04 и *S. acnes* использовали для исследования трехмерной структуры биопленок и ее изменений в присутствии компонентов косметики или НУП. Биопленки исследуемых микроорганизмов выращивали в 24-луночных планшетах Sensoplate (Geiner bio-one, Germany) с плоским стеклянным дном. Использовали два способа получения биопленок: первый основан на методике Coyene et al., 2007 с изменениями. В лунки вносили по 300 мкл суспензии клеток и выдерживали 2 ч при комнатной температуре (за это время происходит адгезия клеток к поверхности). *S. acnes* выдерживали в системе GasPak® в анаэробной атмосфере. По прохождении двух часов суспензию клеток удаляли из лунок, лунки промывали дважды ФР для устранения планктонных клеток, после чего в лунки вносили 1 мл среды, содержащей требуемую концентрацию исследуемого соединения. Второй способ применяли для *S. aureus*: в лунки добавляли среду с исследуемым соединением,

после чего вносили суспензию клеток и культивировали на качалке без этапа предварительной адгезии. Таким образом исследовали формирование микроколоний в условиях равновесия с планктонной культурой. Биопленки *S. aureus* выращивали в течение 24 ч, *C. acnes* – 72 ч. В случае НУП температуру и атмосферу инкубации варьировали для имитации разных условий на коже. По истечении срока выращивания биопленки всех штаммов отмывали дважды стерильным ФР и **окрашивали зеленым флуоресцирующим красителем SYTO9 Green**. После окраски образцы исследовали в инвертированном конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Zeiss, Germany) при помощи программы Zen® 2009. Математическую обработку изображений и вычисление показателей проводили с помощью пакета ImageJ. Анализировали среднюю толщину биопленок (мкм) и объем биомассы на единицу площади (мкм³/мкм²).

Бинарные биопленки *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03, выращенные в присутствии НУП, исследовали методом КЛСМ в сочетании с **методом флуоресцентной гибридизации *in situ*** или FISH. Эксперименты проводили по методике, описанной Nistico et al., 2014. Для гибридизации *C. acnes* RT5 использовали зонд 5'-GCCCAAGATTACACTTCCG-3', описанный Poppert et al., 2010 производства Eurogentec. КЛСМ производили в синем и красном диапазонах флуоресценции, соответствующих эмиссии DAPI и AlexaFluor 546. DAPI использовали как индикатор тотальной биомассы *S. aureus* и *C. acnes*. Бинарные биопленки *C. acnes* и *S. aureus* MFP03, *C. acnes* и *S. epidermidis* MFP04, *S. epidermidis* и *S. aureus*, выращенные на стекловолоконных фильтрах в присутствии косметических средств или НУП, а также без них, исследовали методом окрашивания МТТ и **методом подсчета КОЕ** после диспергирования биопленки. Для этого фильтры с биопленками помещали в пробирки со стерильным ФР, растирали стерильной стеклянной палочкой, после чего гомогенизировали суспензию на лабораторном встряхивателе «Вортекс» в течение 30-60 с в зависимости от типа биопленки. После этого производили серию десятикратных разведений суспензии до 10⁷ раз, и из трех самых высоких разведений делали высев на чашки Петри с агаризованным триптон-соевым бульоном для стафилококков или агаризованной средой RCM для *C. acnes*.

Для выделения матрикса биопленок *C. acnes* RT5 биопленки растили 7 суток на целлюлозных фильтрах на поверхности агаризованной среды RCM. Затем

биомассу собирали и **обрабатывали ультразвуком** на установке Branson Digital Sonifier 250 (США) с экспоненциальным зондом диаметром 3/16 дюйма при 25% (120 мкм) амплитуде и частоте 20 кГц в течение 15 мин. Матрикс биопленок *S. acnes* RT5 выделяли **центрифугированием в градиенте хлорида цезия** на Beckmann coulter Optima X-100 в угловом роторе 70 Ti. При ускорении 170000 g в течение трех часов при комнатной температуре. Достоверность выделения матрикса проверяли методом определения активности внутриклеточной лактатдегидрогеназы (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega) в сочетании с микроскопическим контролем разрушения клеток. Лактатдегидрогеназа является преимущественно внутриклеточным ферментом, в норме не секретирующимся (Chao et al., 1988; Lin et al., 2018), что делает её удобным индикатором разрушения клеток при наличии её активности в супернатанте.

Матрикс биопленок исследовали количественными биохимическими методами. Общее количество органического углерода в образцах матрикса определяли **методом мокрого сжигания** в смеси концентрированной серной кислоты (Sigma) и бихромата калия (Sigma) по методике Walkley, 1947 с изменениями. Определяли количество редуцирующих сахаров (а, следовательно, полисахаридов) в препаратах матрикса **антроновым методом** (Dreywood, 1946). Механизм реакции заключается в образовании окрашенных соединений в результате конденсации фурфуролов, образующихся при воздействии серной кислоты на углеводы, с антроном. Для определения концентрации белков использовали стандартный **протокол определения белков по Бредфорду** (Bradford, 1976). ДНК в растворе матрикса определяли колориметрически по **методу Дисше** (Dische, 1955). Метод основан на реакции дезоксирибозы с дифениламином в ледяной уксусной кислоте при нагревании, в ходе которой образуется оксилевулиновый альдегид, конденсирующийся с дифениламином с образованием окрашенного соединения.

Исследования протеома матрикса биопленок *S. acnes* RT5 методом **масс-спектрометрии по принципу орбитальной ионной ловушки (Orbitrap)** производили на базе Лаборатории полимеров, биополимеров и поверхностей PBS UMR 6270 (Laboratoire de polymeres, biopolymeres, surfaces, PBS) Университета Руана (Руан, Франция). Анализ матрикса и биомассы биопленок *S. acnes* RT5 методом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (surface-enhanced

Raman spectroscopy, SERS) производили на базе лаборатории биотехнологии в нефтегазовой промышленности кафедры физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «Российский государственный университет нефти и газа (национальный исследовательский университет) имени И.М. Губкина», в г. Москве.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния азитромицина на рост биопленок *P. chlororaphis* 449 и его трансформированных штаммов. Показано, что азитромицин в субингибиторных концентрациях (менее 8 мкг/мл) стимулировал рост биопленок сапротрофного дикого штамма *P. chlororaphis* 449, подобно тому, как он стимулирует рост биопленок патогенных штаммов (Kaplan, 2011) что говорит об универсальности явления стимуляции роста биопленок антибиотиками (рис. 1). Также показано, что введение плазмиды (pME6863), содержащей ген ацилгомосеринлактоназы, расщепляющей АГЛ, полностью снимало эффект стимуляции роста биопленок азитромицином. Остальные мутанты, сохранившие синтез АГЛ, стимулировались азитромицином, что говорит о прямой вовлеченности АГЛ-зависимой системы QS в процессы стимуляции роста биопленок. Также было показано, что стимуляция и ингибирование роста биопленок *P. chlororaphis* 449 выражались в увеличении и снижении количества полисахаридного компонента матрикса. Стимулированные биопленки были более устойчивы к тепловому шоку, чем контрольные образцы без антибиотика.

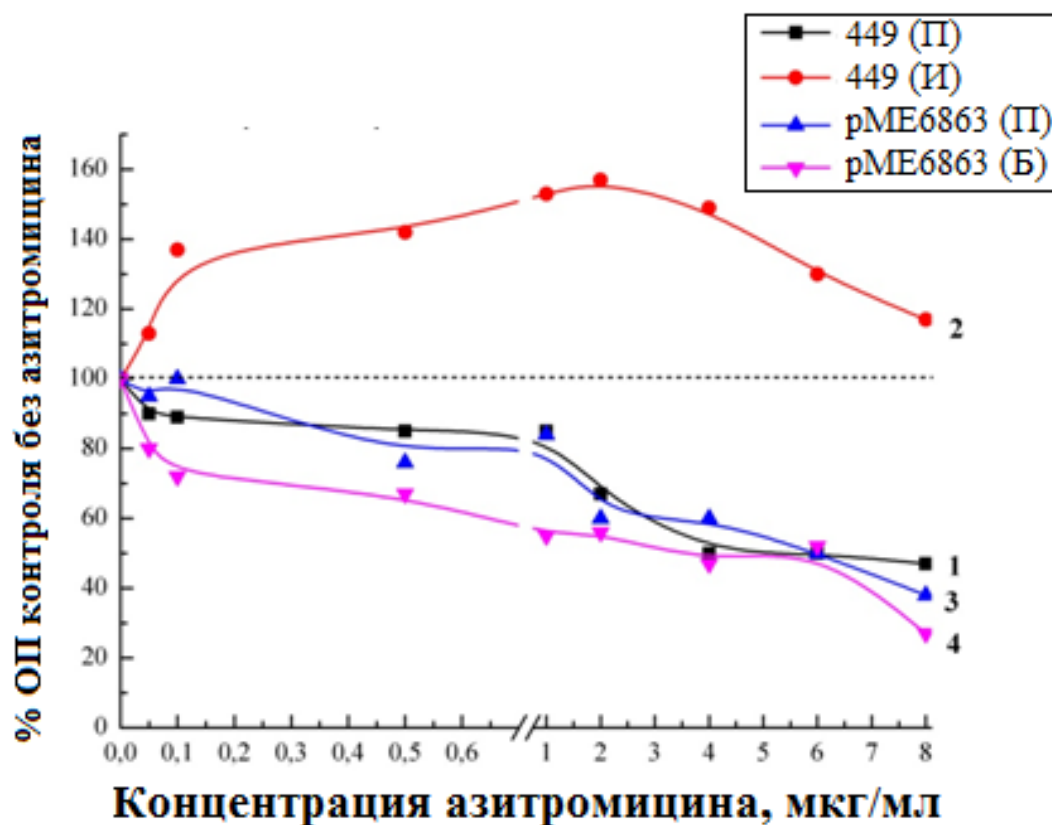


Рис. 1. Зависимость роста планктонной культуры (1, 3) и биопленки (2, 4) *P. chlororaphis* 449 (1, 2) и *P. chlororaphis* 449pME6863 (3, 4) от концентрации азитромицина. Окрашивание биопленки КФ.

Исследование влияния никлозамида на рост биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи. Концентрация 0.1 мкг/мл никлозамида в среде вызывало сильное (до 86% у *M. luteus* C01) снижение количества метаболически активных клеток в биопленке (рис. 2). При этом наличие ДМСО не влияло на метаболическую активность клеток. Концентрация 1 мкг/мл никлозамида снижала количество метаболически активных клеток практически до нуля (0.5-1%) у *S. aureus* MFP03, *M. luteus* C01 и *K. schroeterii* H01. Полученные результаты говорят об эффективности использования никлозамида при борьбе с биопленками, а также позволяют рассматривать никлозамид как перспективный компонент комплексных антибиопленочных препаратов.

Более того, на примере *S. aureus* 209P показана возможность использования никлозамида как возможного компонента бинарных антибиопленочных препаратов совместно с антибиотиком азитромицином: присутствие в среде никлозамида полностью устраняло стимулирующий эффект азитромицина и усиливало его ингибиторное действие.

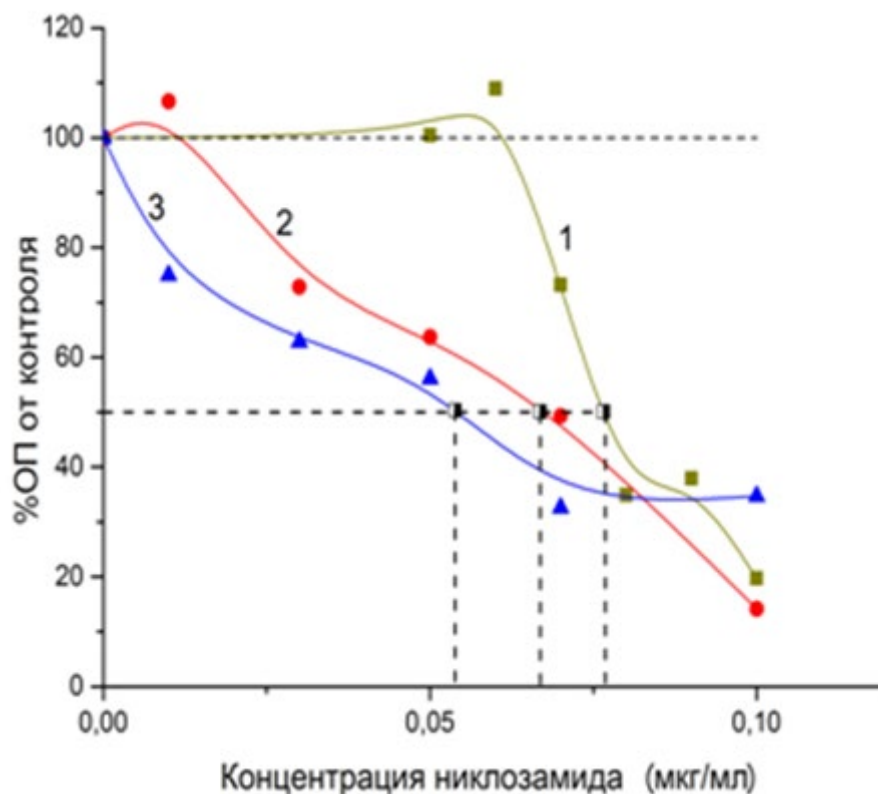


Рис. 2. Влияние никлозамида на рост биопленок микроорганизмов кожной микробиоты. Выращивание на фильтрах из стекловолокна (окрашивание МТТ). 1 – *S. aureus* MFP03; 2 – *M. luteus* C01; 3 – *K. schroeterii* H01 ИД₅₀ соответствуют пересечениям перпендикулярных линий с осью абсцисс. Пунктирная линия – контроль без ингибитора.

Влияние компонентов косметики на моновидовые и бинарные биопленки *S. aureus* MFP03, *S. epidermidis* MFP04 и *C. acnes*. В ходе работы было показано, что ТВУ и PS291®, не оказывая токсического воздействия на планктонные клетки бактерий, значительно снижают общее количество биомассы их биопленок. Интересно, что ФР в тех же концентрациях не только не оказывал существенного воздействия на рост биопленок, но, более того, нивелировал подавляющий эффект PS291®. Это свидетельствует о том, что причина ингибиторного воздействия термальной воды на биопленки *C. acnes* и *S. aureus* определяется особенностями ее химического состава.

PS291® в значительной степени снижал адгезию клеток *S. aureus* к стеклу и образование микроколоний и изменял свойства поверхности клеток обоих микроорганизмов. Клетки *S. aureus* становились более электроотрицательными, а у клеток обоих штаммов *C. acnes* снижалось сродство к полярным органическим

растворителям.

Было изучено влияние ТВУ и PS291® на рост бинарных биопленок *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5, а также *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04. Добавление ТВУ в среду культивирования увеличивало конкурентные свойства *S. epidermidis* MFP04 в бинарных биопленках с *S. aureus* MFP03 по сравнению с контролем, а также увеличивало конкурентные свойства *C. acnes* RT5 в бинарных биопленках с *S. aureus* MFP03 (рис. 3), что выражалось в уменьшении различий в числе КОЕ *S. aureus* и второго компонента биопленки. Эффект PS291® зависел от природы биопленок: в бинарных биопленках *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 он подавлял рост *S. epidermidis* по сравнению с контролем, а в бинарных биопленках *C. acnes* RT5 + *S. aureus* MFP03 он увеличивал конкурентные свойства *C. acnes* RT5, частично ухудшая рост *S. aureus* MFP03.

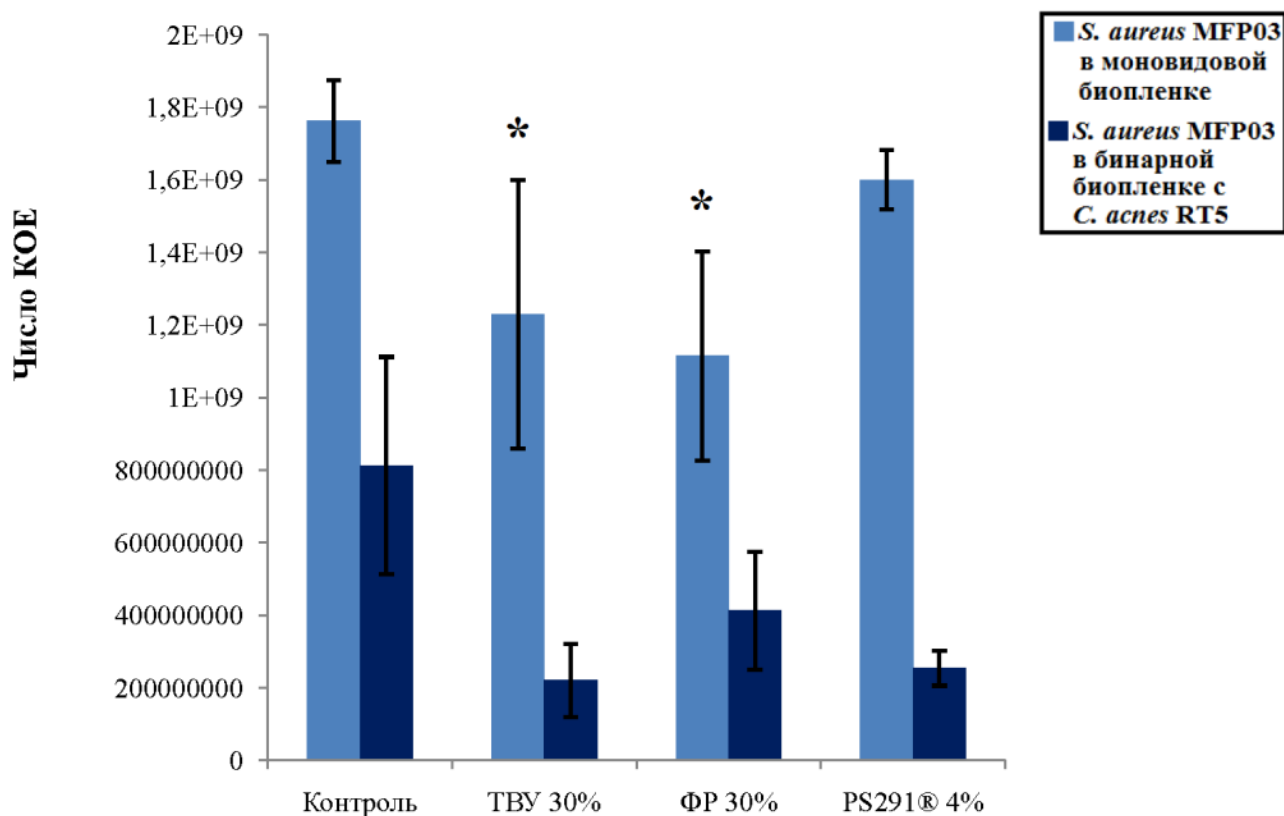


Рис. 3. Число КОЕ *S. aureus* MFP03 в моновидовых и бинарных биопленках с *C. acnes* RT5 при добавлении ТВУ 30%, ФР 30%, PS291® 4%. * - различие достоверно при $p=0.05$.

Влияние НУП на моновидовые и бинарные биопленки *S. aureus* MFP03, *S. epidermidis* MFP04 и *C. acnes*. Было показано, что оба НУП существенно влияют на рост биопленок исследованных микроорганизмов, но не оказывают

значимого эффекта на рост планктонных культур. Наиболее сильным эффектом обладали субмикромольные концентрации, а именно 1×10^{-7} и 1×10^{-8} М. Условия культивирования микроорганизмов (температура, состав газовой фазы) критически важны и определяют характер воздействия пептидов – стимулирующий или ингибирующий.

В случае натрийуретических пептидов в бинарных биопленках *S. aureus* RT5 и *S. aureus* MFP03 оба пептида увеличивали долю биомассы *S. aureus*, хотя в моновидах биопленках происходило значительное ингибирование роста. В случае бинарных биопленок *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 наблюдалась похожая картина: количество биомассы *S. aureus* MFP03, выраженное в числе КОЕ, снижалось в присутствии обоих НУП (рис. 4). При этом, число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 также уменьшалось, однако, баланс числа КОЕ этих видов смещался в сторону *S. epidermidis*, особенно в случае CNP в концентрации 1×10^{-8} М. Полученные результаты подтверждают гипотезу о регуляторной и, возможно, защитной роли НУП кожи человека.

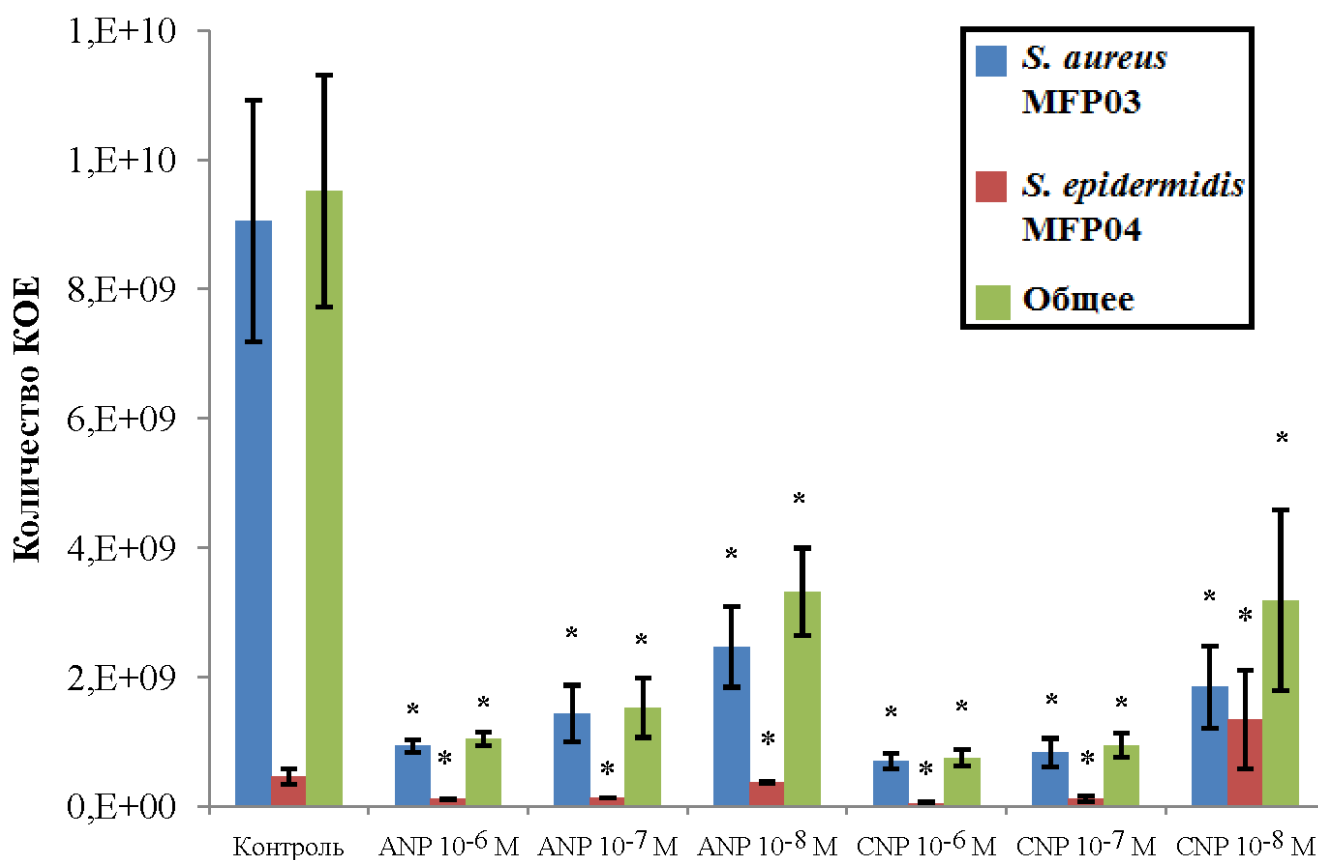


Рис. 4. Число КОЕ *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 в бинарных биопленках при добавлении НУП.

Специфичный для биопленок эффект натрийуретических пептидов может быть объяснен тем, что в организме человека микроорганизмы живут преимущественно в виде мультивидовых биопленок. Особенно это касается кожи, где физико-химические параметры среды не позволяют развиваться планктонной культуре. Разный эффект НУП при разных условиях культивирования может коррелировать с различной ролью и функциями НУП при патологических изменениях кожи (например, при воспалении) или в разных ее микронишах.

Исследование матрикса биопленок *C. acnes* RT5. Количественными биохимическими методами определено наличие и соотношение основных классов соединений, входящих в состав матрикса биопленок (рис. 5). Около 24% органических веществ, по-видимому, представляют собой набор метаболитов, не являющихся нуклеиновыми кислотами, ДНК или полисахаридами. Это, прежде всего, порфирины и интермедиаты их синтеза, органические кислоты и т.д.

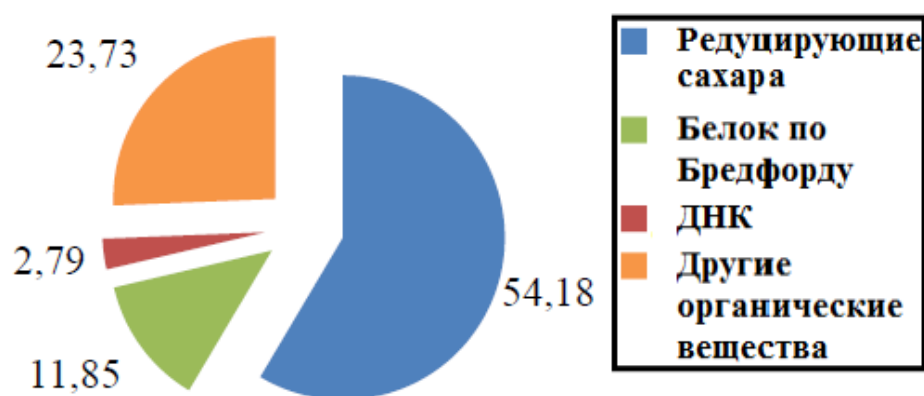


Рис. 5. Процентное соотношение основных классов соединений, входящих в состав матрикса *C. acnes* RT5.

Масс-спектрометрический анализ протеома матрикса биопленок *C. acnes* RT5 показал наличие 447 различных белков. Многие из белков, обнаруженных в матриксе, являются доменами в составе более сложных белков или белковых комплексов (рибосомные белки, каталитические домены и т.д.). Обнаружены протеазы, нуклеазы, ферменты метаболизма сахаров, липидов, а также 48 белков неизвестного назначения и 43 рибосомных белка различной массы (точно определенных и предполагаемых). Их роль в организации матрикса и функциях биопленок требует дальнейшего изучения.

При анализе SERS-спектров выделенного матрикса в сравнении с биомассой до и после выделения матрикса выявлено более 40 выраженных пиков. Положение пиков и их интенсивность устанавливали графически, при этом

учитывали только различия по интенсивности в два и более раза. Профили спектров биомассы биопленок и спектров матрикса *S. acnes*, позволят применять их для идентификации *S. acnes* в сложных биологических объектах и образцах при помощи SERS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стимуляция формирования микробных биопленок при концентрациях антибиотиков ниже ингибиторных – широко распространенное явление, имеющее универсальный характер для многих сапротрофных и патогенных микроорганизмов (Kaplan, 2011). Антибиотик азитромицин применяется для лечения некоторых биопленочных инфекций, нечувствительных к другим антибиотикам. Однако, как мы показали на модели *P. chlororaphis*, он в субингибиторных концентрациях также стимулирует формирование биопленок. Это означает, что при недостаточных дозах антибиотика при антибиотикотерапии или в ходе ее отмены, инфекционный процесс может возобновиться с новой силой или перейти в хроническую стадию. Поэтому крайне актуальным является поиск методов борьбы с явлением стимуляции. Мы показали, что в этом процессе определяющую роль играет нормальное функционирование системы глобальной регуляции метаболизма – QS. Таким образом, ингибиторы этой регуляторной системы представляются перспективными компонентами комплексных антибактериальных препаратов. Как мы установили, стимулированный азитромицином рост биопленок приводит к повышению синтеза полисахаридов и формированию массивного матрикса, играющего защитную роль в отношении биоцидов и стрессовых факторов среды, поэтому подавление биосинтеза данных компонентов матрикса также может оказаться перспективным способом борьбы с этим опасным явлением.

Данный подход актуален не только для псевдомонад, но и для *S. acnes*, чей матрикс также может стать мишенью для антимикробных веществ. Матрикс *S. acnes* RT5 состоит в основном из полисахаридов, что делает возможным регуляцию синтеза полисахаридов матрикса для минимизации роста биопленок или снижения их устойчивости к антибиотикам и другим антибактериальным агентам.

Поскольку возникает все большее количество резистентных штаммов микроорганизмов, а разработка новых антибиотиков встречает значительные

трудности, простые соединения, способные нивелировать стимулирующее действие антибиотиков, или усиливать их антибактериальные свойства, могут дать новую жизнь устаревающим антибиотикам. Одним из таких соединений может стать никлозамид: проведенная нами работа показала его высокую активность против биопленок грамположительных микроорганизмов и способность нивелировать нежелательный стимулирующий эффект азитромицина, что делает возможным создание бинарного препарата на основе азитромицина и никлозамида для борьбы с биопленками.

Косметические средства и их компоненты также активно влияют на рост биопленок микроорганизмов кожи. За счет изменения свойств поверхности клеток, ТВУ™ и PS291® эффективно подавляют рост биопленок *C. acnes* и *S. aureus*, что делает их перспективными в борьбе против акне и других заболеваний кожи, вызываемых данными бактериями. Эти средства могут также изменять баланс численности микроорганизмов кожи от более опасного *S. aureus* к менее опасным *C. acnes* и *S. epidermidis*, что позволяет рекомендовать их для создания новых косметических средств с функцией поддержания баланса кожной микробиоты.

Наконец, собственные продукты метаболизма человека, не обладающие прямым антибактериальным действием, могут регулировать рост бинарных и моновидовых сообществ микроорганизмов кожи. В рамках настоящей работы было показано, что НУП сдвигают баланс численности микроорганизмов в сторону менее опасных видов. Также, НУП, в зависимости от условий среды, могут регулировать формирование биопленок кожной микробиоты что делает их перспективными для применения в косметологии, дерматологии и медицине.

Однако, чтобы подбирать активные в отношении биопленок соединения, необходимо не только изучить их влияние на рост биопленок, но и исследовать состав матрикса биопленок, чтобы целенаправленно воздействовать на биосинтез тех его компонентов, которые особенно важны для функционирования биопленок (как в случае борьбы с ними, так и при их биотехнологическом использовании) Работа по исследованию матрикса *C. acnes* RT5, проведенная в рамках настоящей диссертации, позволит в будущем продвинуться к пониманию функционирования биопленок и, возможно, к нахождению новых эффективных лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что антибиотик азитромицин в субингибиторных концентрациях стимулирует рост биопленок сапротрофного штамма *P. chlororaphis* 449, и в этом процессе участвует АГЛ-зависимая система кворум-сенсинга. Этот факт свидетельствует о перспективности подавления ее функционирования для предотвращения стимулирующего эффекта антибиотика, представляющего опасность в случае патогенных бактерий. Установлено, что стимуляция роста биопленок азитромицином, в первую очередь, выражается в повышенном синтезе полисахаридов матрикса, что приводит к повышенной устойчивости предформированных в присутствии азитромицина биопленок к тепловому шоку.

2. Впервые обнаружен ингибиторный эффект антигельминтного агента никлозамида на рост планктонных культур и биопленок *S. aureus*, *M. luteus* S01 и *K. schroeteri* N01. При этом никлозамид снимает эффект стимуляции роста биопленок *S. aureus* 209P субингибиторными концентрациями азитромицина, что делает его перспективным для использования в комплексных препаратах с этим антибиотиком.

3. Показано, что применяемые в косметике ТВУ™ и PS291® значительно подавляют рост биопленок *S. aureus* MFP03 и *C. acnes*, не проявляя при этом токсического эффекта на клетки микроорганизмов. ТВУ смещает в бинарной биопленке *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 баланс жизнеспособных бактерий в сторону *S. epidermidis* MFP04, а в бинарной биопленке *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5 оба соединения смещают баланс в сторону *C. acnes* RT5, что благоприятно для состояния кожи, поскольку золотистый стафилококк является опасным патогеном.

4. Впервые установлена зависимость от условий культивирования эффекта НУП человека на рост биопленок *S. aureus*, *S. epidermidis* и *C. acnes* RT5, что может определять специфику их влияния на формирование биопленок при различных физиологических состояниях кожи. Показано, что НУП регулируют состав бинарных биопленок комменсалов кожи: усиливают конкурентные преимущества *S. epidermidis* и *C. acnes* RT5 перед *S. aureus*. Эти результаты создают перспективу для использования НУП в косметологии и дерматологии для нормализации баланса микробиоты кожи.

5. Разработана методика выделения матрикса биопленок грамположительных

бактерий. Впервые исследовано соотношение биохимических компонентов матрикса биопленок *C. acnes* RT5. Показано, что доминирующим компонентом матрикса биопленок *C. acnes* RT5 являются полисахариды.

6. Впервые проведено детальное исследование тотального протеома матрикса *C. acnes* RT5. Показано наличие более 400 белков в матриксе, присутствие большого числа ферментов-гидролаз, специфичных к различным субстратам, и других ферментов, обеспечивающих высокий каталитический потенциал матрикса биопленок *C. acnes* RT5.

7. Впервые был проведен SERS-анализ биомассы и матрикса биопленок *C. acnes* RT5, составлен спектральный профиль клеток и матрикса *C. acnes* RT5, что позволит использовать его в дальнейшем для создания базы данных SERS спектров биологических образцов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, входящих в базы Web of Science и Scopus:

1. 2014. Zhurina M.V., Gannesen A.V., Plakunov V.K., Zdrovenko E.L. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms // Microbiology (Moscow). – 2014. – V. 83. – № 6. – P. 713-722

2. Ганнесен А.В., Журина М.В., Веселова М.А., Хмель И.А., Плакунов В.К. Регуляция процесса формирования биопленок *pseudomonas chlororaphis* в системе *in vitro* // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 3. – С. 281-290.

3. N'Diaye A., Gannesen A., Borrel V., Maillot O., Enault J., Racine P-J, Plakunov V., Chevalier S., Lesouhaitier O., Feuilloley M.G.J. Substance P and calcitonin gene-related peptide: key regulators of cutaneous microbiota homeostasis // Frontiers in endocrinology. - 2017. – V.8. № 15.

4. Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Штратникова В.Ю., Плакунов В.К. Никлозамид как перспективный антибиопленочный агент // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 4. – С. 439-447.

5. Gannesen A.V., Borrel V., Lefeuvre L., Netrusov A.I., Konto-Ghiorghi Y., Plakunov V.K., Feuilloley M.G.J.. Effect of two cosmetic compounds on the growth, biofilm formation activity and surface properties of acneic strains of *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* // MicrobiologyOpen. – 2018. - e659.

6. Ганнесен А.В., Лезуатье О., Нетрусов А.И., Плакунов В.К., Фейоле М.Ж.Ж. Регуляция формирования моновидовых и бинарных биопленок кожных

Staphylococcus epidermidis и *Staphylococcus aureus* натрийуретическими пептидами человека // Микробиология. – 2018. – Т. 87. – № 5. – С. 1-14.

Публикации в изданиях, входящих в базу РИНЦ (RSCI):

1. 2014. Zhurina M.V., Gannesen A.V., Plakunov V.K., Zdorovenko E.L. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms // Microbiology (Moscow). – 2014. – V. 83. – № 6. – P. 713-722

2. Ганнесен А.В., Журина М.В., Веселова М.А., Хмель И.А., Плакунов В.К. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе *in vitro* // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 3. – С. 281-290.

3. Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Штратникова В.Ю., Плакунов В.К. Никлозамид как перспективный антибиопленочный агент // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 4. – С. 439-447.

4. Ганнесен А.В., Лезуатье О., Нетрусов А.И., Плакунов В.К., Фейоле М.Ж.Ж. Регуляция формирования моновидовых и бинарных биопленок кожных *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus* натрийуретическими пептидами человека // Микробиология. – 2018. – Т. 87. – № 5. – С. 1-14.

Тезисы и доклады на научных конференциях:

1. Значение матрикса бактериальных биопленок для их устойчивости к азитромицину и тепловому шоку (Устный) Авторы: Мартьянов С.В., Ганнесен А.В., Журина М.В., Плакунов В.К. III Всероссийская научно-практическая конференция Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле., Байкальский музей, пос. Листвянка, Иркутская область, 2014. Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН Иркутск. 2014.

2. Ганнесен А.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Нетрусов А.И. Участие системы quorum sensing в процессе стимуляции азитромицином роста биопленок *Pseudomonas chlororaphis* 449 / XXVII Зимняя молодежная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Институт биоорганической химии РАН, Россия, 9-12 февраля, 2015. М.: Учебно-научный центр ИБХ. С. 100. 2015.

3. Регуляция формирования микробных биопленок как перспективное направление биотехнологии и медицины. (Устный) Авторы: Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Нетрусов А.И. VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы

развития», Москва, Россия, 17-20 марта 2015. М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. С. 31-32. 2015.

4. Никлозамид как перспективный агент в борьбе с микробными биопленками. (Устный) Авторы: Ганнесен А.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", Москва, Россия, 13-17 апреля 2015. М.: «МАКС-Пресс» Москва. С. 213-214. 2015.

5. Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Плакунов В.К. Новый подход к традиционным биоцидам: использование лекарственных препаратов в качестве антибиопленочных агентов / X молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». Москва, Россия 27-30 октября, 2015. М.: «МАКС-Пресс» Москва. 2015.

6. Gannesen A., Borrel V., Enault J., Ionescu M.A., Lefeuvre L., Plakunov V., Netrusov A., Feuilloley M. Growth, virulence and biofilm formation activity of acneic strains of propionibacterium acnes: influence of the microenvironment and effect of urriage spring thermal water / 4th International congress «Cosminnov». Orleans, France 24-25 May, 2016. Orleans, № 80 / OC – FC – PC. 2016.

7. Zhurina M.V., Mart'yanov S.V., Gannesen A.V., Teteneva N.A., Plakunov V.K. The new antibiofilm drug, based on the combination of alkylhydroxybenzene compound and azithromycin / International congress «Antimicrobial resistance in microbial biofilms and options for the treatment». Gent, Belgium 5-7 October, 2016. № 064. 2016.

8. Тетенева Н.А., Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Плакунов В.К. Новый антибиопленочный агент - никлозамид / XI Международная школа-конференция с международным участием "Актуальные аспекты современной микробиологии". Москва, Россия 1-2 ноября, 2016. М.: «МАКС-Пресс» Москва. С. 140-142. 2016.

9. Журина М.В., Тетенева Н.А., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Плакунов В.К. Поиск новых антибиопленочных агентов: никлозамид / XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва, Россия 7-10 февраля, 2017. М.: Учебно-научный центр ИБХ. С. 121. 2017.

10. Ганнесен А.В., Боррель В., Лёфёвр Л., Нетрусов А.И., Плакунов

В.К., Фейоле М. Влияние косметических средств на рост биопленок микроорганизмов-представителей микробиоты кожи / 21-я Международная пушинская школа-конференция молодых учёных "Биология - наука XXI века". Пушино, Россия 17-21 апреля, 2017. Пушино. С. 14. 2017.

11. Gannesen A.V., Racine P.J., Robert M., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilloley, M G.J Skin-microbiote communication: human natriuretic peptides as regulators of propionibacterium acnes and staphylococcus aureus biofilm formation /. 9th International Conference on Skin Ageing and Challenges. Porto, Portugal 25-28 February, 2018. Porto, P. 36.