

Антибиоплёночная активность фукоиданов бурых водорослей

*Е. В. МАТОСОВА¹, Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, М. И. КУСАЙКИН²,
Б. Г. АНДРЮКОВ¹, И. Д. МАКАРЕНКОВА¹, М. Ю. ЩЕЛКАНОВ¹,
И. Н. ЛЯПУН¹, М. П. БЫНИНА¹, С. П. ЕРМАКОВА², Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА²

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Antibiofilm Activity of Fukoidans Isolated from Brown Algae

*EKATERINA V. MATOSOVA¹, NATALIA N. BESEDNOVA¹, MIKHAIL I. KUSAYKIN²,
BORIS G. ANDRYUKOV¹, ILONA D. MAKARENKOVA¹,
MIKHAIL YU. SHCHELKANOV¹, IRINA N. LYAPUN¹, MARINA P. BYNINA¹,
SVETLANA P. ERMAKOVA², TATYANA N. ZVYAGINTSEVA²

¹ G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia

² G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia

Резюме

Биоплёнки играют значительную роль в существовании бактерий в неблагоприятных условиях и патогенезе инфекций. Они способствуют созданию резервуаров резистентных к антибиотикам возбудителей. Это определяет актуальность поиска биологически активных веществ, ингибирующих формирование биоплёнок. В последние годы объектом интенсивного изучения являются фукоиданы — сульфатированные полисахариды из морских бурых водорослей, обладающие широким полифункциональным спектром действия. В работе исследовали их влияние на формирование биоплёнки *Yersinia pseudotuberculosis* в динамической модели, имитирующей естественные условия экосистем фукоиданов, принадлежащих к разным структурным группам. Они синтезируются бурными водорослями *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides* и *Saccharina japonica*. Наиболее выраженной антибиоплёночной активностью обладал фукоидан из *F. evanescens*. Авторами разработан новый подход, позволяющий получать устойчивые результаты разнонаправленного действия сульфатированных полисахаридов на биоплёнокообразование *Y. pseudotuberculosis*.

Ключевые слова: биоплёнки; *Yersinia pseudotuberculosis*; ингибирование; фукоиданы (сульфатированные полисахариды); бурые водоросли

Для цитирования: Матосова Е. В., Беседнова Н. Н., Кусайкин М. И., Андрюков Б. Г., Макаренкова И. Д., Щелканов М. Ю., Ляпун И. Н., Бынина М. П., Ермакова С. П., Звягинцева Т. Н. Антибиоплёночная активность фукоиданов бурых водорослей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68 (9–10): 5–11. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-5-11>.

Abstract

Biofilms play a significant role in the existence of bacteria under adverse conditions and the pathogenesis of infections. They contribute to the creation of reservoirs of antibiotic-resistant pathogens. This determines the relevance of the search for biologically active substances that inhibit the formation of biofilms. In recent years, the objects of intensive study are fucoidans — sulfated polysaccharides from marine brown algae, which have a wide polyfunctional spectrum of action. Their influence on the formation of *Yersinia pseudotuberculosis* biofilm in a dynamic model simulating the natural conditions of ecosystems of fucoidans belonging to different structural groups was investigated in this study. They are synthesized by brown algae: *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides*, and *Saccharina japonica*. The fucoidan isolated from *F. evanescens* have showed the most pronounced antibiotic activity. The authors developed a new approach that allows obtaining stable results of multidirectional action of sulfated polysaccharides on the biofilm formation of *Y. pseudotuberculosis*.

Keywords: biofilms, *Yersinia pseudotuberculosis*, inhibition, fucoidans (sulfated polysaccharides), brown algae.

For citation: Matosova E. V., Besednova N. N., Kusaikin M. I., Andryukov B. G., Makarenkova I. D., Shchelkanov M. Yu., Lyapun I. N., Bynina M. P., Ermakova S. P., Zvyagintseva T. N. Antibiofilm activity of fucoidans isolated from brown algae. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 5–11. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-5-11>.

Введение

В естественной среде обитания бактерии формируют биоплёнки — заключённые в матриксе структурированные микробные сообщества, фиксированные к поверхности и объединённые си-

стемой Quorum Sensing [1, 2]. Существование в составе биоплёнок позволяет бактериям выживать в неблагоприятных условиях, в организме противостоять факторам врождённого иммунитета, а также защищаться от воздействия антибактериальных средств, значительно снижая эффектив-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Сельская, д. 1, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, г. Владивосток, 690087, Россия. E-mail: e_matosova@mail.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 1 Selskaya st., G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087 Russia. E-mail: e_matosova@mail.ru

ность антибиотикотерапии и создавая резервуары возбудителей инфекции на различных поверхностях, в том числе медицинского назначения [2].

Бактерии рода *Yersinia* в течение последних десятилетий занимают особое место среди возбудителей сапронозных инфекций благодаря своим уникальным психрофильным свойствам, позволяющим им выживать и сохранять патогенность в различных условиях окружающей среды, и в том числе при попадании в морские экосистемы. Способность к спонтанному заражению этими бактериями наземных и морских организмов свидетельствует об отсутствии специфического хозяина и о повсеместном распространении этих микроорганизмов в окружающей среде [3–5].

Среди патогенных иерсиний повышенное внимание уделяется виду *Y.pseudotuberculosis*, у которого биоплёнкообразование является важным фактором патогенности [3–6], а также эволюционно близкому к нему высоковирулентному возбудителю чумы — *Yersinia pestis*, образующему биоплёнку в желудочно-кишечном тракте блох [1, 5, 7]. Полимерный матрикс, входящий в состав биоплёнки *Yersinia*, содержит гомополимер N-ацетил-D-глюкозамина, синтез которого регулируется на генетическом уровне [1, 3]. Оба патогена имеют высокую степень геномной гомологии, и формирование биоплёнки, имеющей ключевое значение в патогенезе этих инфекций, регулируется идентичным генетическим опероном hmsHFRS [6, 8]. Такое близкое родство возбудителей обуславливает актуальность поиска и разработки препаратов, обладающих антибиоплёночным действием в отношении *Y.pseudotuberculosis*. Особый интерес для исследования представляют водорастворимые, сульфатированные полисахариды (СПС) — фукоиданы из морских бурых водорослей обладающие уникальной химической структурой, биосовместимостью и биodeградируемостью, низкой токсичностью и широким спектром фармакологического действия [9–13].

Многочисленные исследования выявили ряд ассоциативных механизмов антибактериального действия фукоиданов (иммуномодулирующее, антиадгезивное, бактериостатическое, бактерицидное) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе, против *Y.pseudotuberculosis* [12, 13]. С учётом важного патогенетического значения биоплёнок в развитии хронических инфекций, связанных с бактериями рода *Yersinia*, исследование антибиоплёночного действия фукоиданов представляет научный и практический интерес.

Цель исследования — изучение влияния фукоиданов разной структуры на формирование биоплёнки *Yersinia pseudotuberculosis* в динамической модели, имитирующей естественные условия экосистем.

Материал и методы

Культура. В работе использовали вирулентный штамм *Y.pseudotuberculosis* № 512 I серовара из коллекции микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора. Бактерии выращивали на скошенном агаре (АО «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия) в течение 48 ч при температуре +4–6°C. Далее готовили взвесь бактерий в растворе бульона Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) с 0,85% раствором NaCl в соотношении 1:2 до концентрации 10^6 мк/мл (по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича).

Сульфатированные полисахариды. В работе исследовали различные по химической структуре СПС из бурых водорослей Тихого океана — *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides* и *Saccharina japonica*, выделенные в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН [14] и очищенные с помощью ионообменной хроматографии [15].

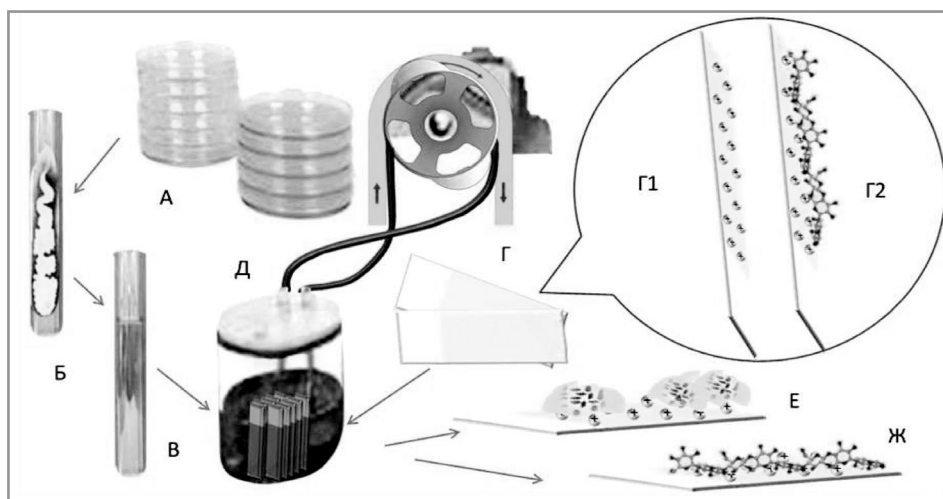
Выращивание биоплёнки. Для выращивания биоплёнки в качестве абиотической подложки использовались слайды со специальным адгезивным покрытием производства компании ThermoFisher Scientific (США) — Superfrost™ Plus (с постоянным положительным зарядом на поверхности) и Polysine™ Adhesion Slides (с электростатической и биохимической адгезией). Исследуемые полисахариды в виде водных растворов сухих экстрактов (1, 10 и 20 мг/мл) сорбировались на поверхность слайдов в течение 10 мин при комнатной температуре (не связавшиеся фукоиданы смывали проточной дистиллированной водой). В качестве контроля использовались соответствующие типы слайдов без полисахаридов, инкубированные в аналогичных условиях.

Динамическая модель формирования биоплёнки. Для исследования формирования биоплёнки применялась динамическая модель [16], представляющая собой закрытую систему, состоящую из перистальтического насоса и проточной камеры — широкогорлого химического стакана (600 мл) с крышкой и полихлорвиниловыми трубками. Трубки соединялись с перистальтическим насосом (Суперстальтик-02, Россия), создающим регулируемый ток жидкости (50 мл/мин) необходимый для инициирования процесса образования биоплёнки.

Суть метода заключалась в инокулировании планктонных форм *Y.pseudotuberculosis* в смесь бульона Хоттингера с 0,85% раствором NaCl (1:2), которая циркулировала в закрытой системе. Слайды с фукоиданами помещали вертикально в ёмкость с суспензией *Y.pseudotuberculosis* и инкубировали в течение 72 ч при комнатной температуре. После инкубации слайды трёхкратно промывали дистиллированной водой для освобождения от планктонных форм бактерий (рисунок).

Количественную оценку биомассы биоплёнки проводили путём измерения оптической плотности окрашенных препаратов. Для окрашивания слайдов использовался метод Sternheimer–Malbin [2]: 2-компонентный краситель (А — кристаллический фиолетовый 3,0 г, этиловый спирт 95%, 20,0 мл, дистиллированная вода 80,0 мл и оксалат аммония 0,8 г; Б — сафранин О, 0,25 г, этиловый спирт 95%, 10,0 мл, дистиллированная вода 90,0 мл) смешивали в отношении 1:1 перед постановкой реакции. Слайды помещали в готовый краситель вертикально, окрашивали 15 мин, после чего промывали дистиллированной водой. Окраска биоплёнок основывалась на способности компонентов красителя (кристаллического фиолетового и сафранина) связываться с матриксом биоплёнок [2, 17, 18]. Окрашенные слайды подсушивали на воздухе 5 мин и измеряли экстинкции в 60 разных точках поверхности слайдов на спектрофотометре АКЩ-01 (светофильтр 595 нм).

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 7. Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали *t*-критерий Стьюдента. Проверку гипотезы о нормальности распределения проводили по количественным ха-



Динамическая модель формирования биоплёнки *Y. pseudotuberculosis* под влиянием фукоиданов из бурых водорослей.

Примечание. А — выделение чистой культуры *Y. pseudotuberculosis*; Б — накопление бактериальной массы на скошенном агаре; В — инокулирование планктонных форм бактерий в смесь бульона Хоттингера с 0,85% раствором NaCl (1:2); Г — слайды со специальным адгезивным покрытием в качестве абиотической подложки: Г1 — слайды без фукоидана для контроля эксперимента; Г2 — слайды с сорбированным на поверхности фукоиданом; Д — культивирование биоплёнки на слайдах в динамической закрытой системе; Е — слайды контроля со сформированной биоплёнкой *Y. pseudotuberculosis*; Ж — ингибирование роста биоплёнки на слайдах с фукоиданом.

Dynamic model of *Y. pseudotuberculosis* biofilm formation under the influence of fucoidans isolated from brown algae.

Note. А — isolation of a pure culture of *Y. pseudotuberculosis*; Б — accumulation of bacterial mass on agar slants; В — inoculation of planktonic forms of bacteria into a mixture of Hottinger broth with 0.85% NaCl solution (1:2); Г — slides with a special adhesive coating as an abiotic substrate: Г1 — slides without fucoidan to control the experiment; Г2 — slides with fucoidan sorbed on the surface; Д — biofilm cultivation on slides in a dynamic closed system; Е — control slides with a formed *Y. pseudotuberculosis* biofilm; Ж — inhibition of biofilm growth on slides with fucoidan.

рактическим распределением (коэффициенты асимметрии и эксцесса, равенству дисперсий и критерию Пирсона, уровень значимости $\alpha=0,05$). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равный 0,05.

Результаты

На первом этапе решалась задача выбора подложки, оптимальной для формирования биоплёнки. Расчёт показателей коэффициентов вариации разбросов (V_x) полученных значений оптической плотности показал, что положительный заряд слайдов SuperFrost™ Plus Adhesion Slides обеспечивает более равномерные адгезивные характеристики поверхности. Это создавало незначительную степень рассеивания данных (среднее значение $V_x=8,58$ при $n=720$). Поэтому последующая оценка результатов проводилась только на основании данных, полученных на этих слайдах.

В работе использовались фукоиданы, различающиеся по структуре (табл. 1).

Анализ действия полностью сульфатированного (1→3)- α -L-фукана, выделенного из *S. cicho-*

roides, показал отсутствие статистически значимого ингибирования формирования биоплёнки. При концентрациях полисахарида 10 и 20 мг/мл наблюдалась индукция роста биоплёнки ($p<0,001$) (табл. 2).

При анализе результатов влияния на формирование биоплёнок частично ацетилированного 1→3- α -L-фукана с высоким содержанием галактозы из *S. japonica* было установлено, что в высокой (20 мг/мл) и средней (10 мг/мл) концентрациях полисахарид вызывал статистически значимое ($p<0,001$) и равномерное ($V=5,99$) ингибирование роста биоплёнки (табл. 3).

Наиболее интересные результаты, по мнению авторов, получены при исследовании частично ацетилированного 1→3;1→4- α -L-фукана из *F. evanescens*. Ингибирование роста биоплёнки *Y. pseudotuberculosis* было статистически значимым ($p<0,001$) и достигало 29%

по сравнению с контролем. Как и в случае с результатами, полученными при использовании фукоидана из *S. japonica*, подавление роста биоплёнки имело зависимость от концентрации полисахарида и было наиболее выраженным в концентрации 10 и 20 мг/мл (табл. 4).

Обсуждение

Согласно оценкам Международного центра по контролю за заболеваниями (CDC) и Американского национального института здоровья (NIH), 65–80% всех бактериальных инфекций во всём мире связаны с биоплёнками [2, 22]. Как правило, возбудители хронических инфекций характеризуются высокой устойчивостью к антибиотикам и выраженной способностью уклоняться от иммунной системы макроорганизма [2, 6, 23]. Важной особенностью является то, что биоплёнки, преимущественно, образуются в среде с током жидкости [22].

Во всём мире ведётся активный поиск средств борьбы с биоплёночными инфекциями. Огромное химическое разнообразие веществ,

Таблица 1. Структурные характеристики фукоиданов

Table 1. Structural characteristics of fucoidans

Источник фукоидана	Моносахаридный состав Fuc/Gal/Man/Xyl/Rha	SO ₃ ⁻ , %	Молекулярная масса, кДа фукозы	Тип связей между остатками	Ссылка
<i>S.cichorioides</i>	98/2/0/0/0	36	773	α -(1→3)	[19]
<i>S.japonica</i>	57/31/1/2/3	23	160	α -(1→3)	[20]
<i>Fevanescens</i>	92,1/5,3/0/2,6/0	32,7	340	α -(1→3);(1→4)	[21]

Таблица 2. Влияние фукоидана, выделенного из бурых водорослей *S.cichorioides*, на формирование биоплёнок *Y.pseudotuberculosis*

Table 2. Effect of fucoidan isolated from brown algae *S.cichorioides* on the formation of *Y.pseudotuberculosis* biofilms

Показатели	Концентрация <i>S.cichorioides</i> , мг/мл			Контроль
	1,0	10,0	20,0	
Оптическая плотность ($M \pm SD$), у. е.	60,65±4,43	65,33±6,86	65,28±6,51	61,60±5,13
Коэффициент вариации (V), %	7,31	10,50	9,97	8,32
Число наблюдений (<i>n</i>)	60	60	60	60
Значимость различий с контролем, (<i>p</i>)	<i>p</i> =0,279	<i>p</i> =0,001	<i>p</i> =0,001	

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: $M \pm SD$ (Mean±Standard Deviation) — средняя арифметическая величина ± стандартное отклонение; *p* — значимость полученных значений по сравнению с контролем (*t*-критерий Стьюдента).
Note. Here and in Tables 3, 4: $M \pm SD$ (Mean±Standard Deviation) — arithmetic mean ± standard deviation; *p* — significance of the obtained values compared to the control (Student's *t*-test).

Таблица 3. Влияние фукоидана, выделенного из бурых водорослей *S.japonica*, на формирование биоплёнок *Y.pseudotuberculosis*

Table 3. Effect of fucoidan isolated from brown algae *S.japonica* on the formation of *Y.pseudotuberculosis* biofilms

Показатели	Концентрация <i>S.japonica</i> , мг/мл			Контроль
	1,0	10,0	20,0	
Оптическая плотность ($M \pm SD$), у. е.	41,15±3,88	38,20±1,81	38,25±2,77	42,15±3,00
Коэффициент вариации, V, %	9,44	4,74	7,23	7,12
Число наблюдений, <i>n</i>	60	60	60	60
Значимость различий с контролем, (<i>p</i>)	<i>p</i> =0,117	<i>p</i> =0,000	<i>p</i> =0,000	

Таблица 4. Влияние фукоидана, выделенного из бурых водорослей *Fevanescens*, на формирование биоплёнок *Y.pseudotuberculosis*

Table 4. Effect of fucoidan isolated from brown algae *Fevanescens* on the formation of *Y.pseudotuberculosis* biofilms

Показатели	Концентрация <i>Fevanescens</i> , мг/мл			Контроль
	1,0	10,0	20,0	
Оптическая плотность ($M \pm SD$), у. е.	63,52±7,62	58,27±4,54	58,60±5,44	81,23±7,49
Коэффициент вариации, V, %	11,99	7,78	9,28	9,22
Число наблюдений, <i>n</i>	60	60	60	60
Значимость различий с контролем, (<i>p</i>)	<i>p</i> =0,000	<i>p</i> =0,000	<i>p</i> =0,000	

биосинтезируемых морскими водорослями обеспечивает богатый потенциал для изучения и разработки новых соединений, способных ингибировать бактериальную колонизацию и образование биоплёнки, что может иметь решающее значение для создания альтернативной стратегии борьбы с антибиотикорезистентными бактериальными инфекциями.

В качестве тестового микроорганизма для исследования нами был выбран штамм *Y. pseudotuberculosis*, что связано с ключевой ролью в жизненном цикле возбудителей сапронозной инфекции биоплёнки, опосредующей выживание и сохранение патогенных свойств этих бактерий не только в организме, но и в объектах окружающей среды [1, 6].

Нами была использована динамическая модель образования биоплёнки *Y.pseudotuberculosis*

в закрытой проточной системе, что позволяет точно моделировать естественные условия образования биоплёнок [16].

Ранее проведённые исследования показали, что, как и все бентосные морские фотосинтезирующие организмы, бурые водоросли способны вырабатывать эффективные биологически активные вещества, главным компонентом которых являются полисахариды, не имеющие аналогов в наземных организмах и обладающие разновекторным биологическим действием [12, 13, 23, 24]. Биоактивность фукоиданов обусловлена структурными особенностями молекул фукоиданов, с которыми исследователи связывают ингибирование адгезии, блокирование образования клеточной стенки грамотрицательных бактерий, активности гиалуронидазы и индукцию их гибели [12, 14, 24, 25].

Для стандартизации условий, независимых от качества и свойств используемого материала, при выращивании биоплёнки был экспериментально определён тип абиотической подложки — слайды Superfrost™ Plus со специальным равномерным адгезивным покрытием.

Использованный в настоящей работе двухкомпонентный краситель по Sternheimer–Malbin, по мнению R. R. Haug [2], является наиболее предпочтительным для окраски биомассы биоплёнки. При этом входящий в состав кристаллический фиолетовый является основным красителем и связывается с отрицательно заряженными поверхностными молекулами полисахаридов матрикса [18]. Сафранин суправитально окрашивает бактериальные клетки в биоплёнке, которые при этом сохраняют подвижность, что даёт возможность оценить их жизнеспособность [2, 18].

Применённый метод вертикального сканирования окрашенных биоплёнок позволил получить сравнительные 720 количественных значений оптической плотности и провести их последующий статистический анализ.

Был выявлен низко вариабельный равномерный эффект статистически значимого ингибирования формирования биоплёнки под влиянием фукоиданов, выделенных из *S. japonica* (в высоких и средних концентрациях) и *Fevanescens*. При этом подавление биоплёнкообразования *Y.pseudotuberculosis* фукоиданами, выделенными из *Fevanescens*, было наиболее выраженным при всех исследуемых концентрациях полисахарида на слайдах (1, 10 и 20 мг/мл). Выявленная индукция роста биоплёнки под действием фукоидана из *S.cichorioides* была расценена авторами как следствие повышения шероховатости и рельефа поверхности слайдов в концентрациях 10 и 20 мг/мл.

Из проведённых ранее исследований известно, что одно из направлений антибиоплёночного действия фукоиданов может быть связано с механизмами подавления начальной стадии формирования биоплёнки — адгезии бактерий, которая опосредуется целым рядом факторов колонизации [16, 24, 26].

Значение этого механизма у СПС в отношении *Y.pseudotuberculosis* приобретает особую важность, поскольку у этого вида бактерий адгезия является не только начальным звеном биоплёнкообразования, но и ключевым этапом патогенеза псевдотуберкулёзной инфекции. Адгезия необходима микробу для его прикрепления к поверхности клеток слизистых оболочек кишечника и последующей инвазии в них и осуществляется при помощи пилей и компонентов наружной мембраны [1, 3, 6].

Учитывая идентичность химического состава биоплёнок у *Y.pseudotuberculosis* и *Y.pestis*

и единый механизм генетической регуляции их формирования, полученные результаты можно интерполировать на природные штаммы возбудителей псевдотуберкулёза и чумы.

По мнению А. Busetti и др. [24] механизм и выраженность ингибирующего антиплёночного эффекта полисахаридов бурых водорослей зависит от типа тестовых микроорганизмов — грам-отрицательных или грамположительных бактерий и от химической структуры фукоиданов. В свою очередь, химический состав полисахаридов и их биологические свойства зависят от вида водорослей, места обитания и времени сбора водорослей [12, 14, 27].

Исследованные в работе фукоиданы бурых водорослей дальневосточных морей являются представителями разных структурных групп [12, 14, 15, 19–21]. Углеводная цепь СПС, выделенных из *Fevanescens*, состоит из остатков фукозы, связанных чередующимися α -(1→3)- и α -(1→4)-гликозидными связями. Тогда как главная цепь полисахаридов, выделенных из *S.cichorioides* и *S.japonica*, построена по общему для представителей порядка *Laminariales* плану и состоит из остатков фукозы, связанных только α -(1→3)-гликозидными связями. Полисахарид, выделенный из *S. japonica* представляет собой галактофукан, сульфатированный по обоим моносахаридным остаткам. Необходимо отметить, что различия в химической структуре фукоиданов обуславливают и различия в пространственной упаковке их молекул [21], что также может играть важную роль в проявлении биологической активности.

Большинство авторов [12, 13, 23, 24] рассматривает СПС в качестве идеальных и перспективных кандидатов в эффективные антиадгезины, не вызывающие привыкания у бактерий. В связи с этим использование фукоиданов может стать альтернативной стратегией защиты от инфекций.

Морская среда содержит очень богатый источник потенциальных биомедицинских соединений. Среди этих соединений сульфатированные полисахариды, выделенные из бурых водорослей, привлекают особое внимание, особенно в свете поиска антимикробных стратегий, альтернативных современным антибиотикам.

Высокая актуальность проблемы формирования биоплёнки патогенными бактериями в организме и объектах окружающей среды связана с её повышенной устойчивостью к антимикробной терапии и иммунным защитным реакциям, появлением затяжных и хронических инфекций. Научная гипотеза проведённого нами исследования строилась на возможном ингибировании формирования биоплёнок *Y.pseudotuberculosis* сульфатированными полисахаридами, выделенными из бурых водорослей дальневосточных мо-

рей, обладающими широким спектром биологической активности.

Таким образом, полученные результаты позволили установить, что исследованные вещества, принадлежащие к разным структурным группам фукоиданов, обладают ингибирующей активностью в отношении формирования биоплёнки *Y.pseudotuberculosis* на абиотической поверхности. Это было наиболее выражено у полисахаридов, выделенных из водоросли *Fevanescens*. Выявленный биотический эффект позволяет предположить его связь со специфической линейной структурой основной цепи фукоиданов этой группы.

Для суждения об универсальном характере ингибирующего эффекта сульфатированных полисахаридов необходимо продолжить исследования влияния фукоиданов на формирование биоплёнок другими бактериальными моделями, а также ассоциированных с природными биотическими поверхностями.

Литература/References

1. Zhou D., Yang R. Formation and regulation of *Yersinia* biofilms. *Protein & Cell*. 2011; 2: 173–179.
2. Harr R. R. Medical Laboratory Science Review. New York: F. A. Davis Company; 2012.
3. Erickson D.L., Jarrett C.O., Wren B.W., Hinnebusch B.J. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol*. 2006; 188: 1113–1119.
4. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Рассказов В.А. Исследование влияния биологически активных веществ на формирование бактериальных биоплёнок. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014; 57 (3): 54–55. [Terenteva N.A., Timchenko N.F., Rasskazov V.A. Study of biological active substances on the bacterial biofilm formation. *Health. Medical ecology. Science*. 2014; 57 (3): 54–55. (In Russian)]
5. Масюк А.Г., Елисейкина М.Г., Терентьева Н.А., Долматова Л.С., Тимченко Н.Ф. Влияние биологически активных веществ из морских организмов на формирование биоплёнки *Yersinia pseudotuberculosis* на биотической поверхности. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; 72 (5): 88–90. doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1115939>. [Masuk A.G., Eliseikina M.G., Terenteva N.A., Dolmatova L.S., Timchenko N.F. Characteristics of the influence of substances from marine organisms on biofilm formation *Yersinia pseudotuberculosis* on biotic surface. *Health. Medical ecology. Science*. 2017; 72 (5): 88–90. doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1115939>. (In Russian)]
6. Guo X.P., Ren G.X., Zhu H., Mao X.J., Sun Y.C. Differential regulation of the hmsCDE operon in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* by the Rcs phosphorelay system. *Sci Rep*. 2015; 5: 8412.
7. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 24 (96): 14043–14048.
8. Fang N., Yang H., Fang H., Liu L., Zhang Y., Wang L. et al. RcsAB is a major repressor of *Yersinia* biofilm development through directly acting on hmsCDE, hmsT, and hmsHFRS. *Sci Rep*. 2015; 5: 9566.
9. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. Therapies from Fucoidan: An Update. *Mar. Drugs*. 2015; 13: 5920–5946.
10. Макаренкова И.Д., Ахматова Н.К., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н. Морфофункциональные изменения дендритных клеток под действием сульфатированных полисахаридов бурых водорослей. *Биомедицинская химия*. 2017; 63 (1): 39–46. doi: <https://doi.org/10.18097/PBMC20176301039>. [Makarenkova I.D., Akhmatova N.K., Ermakova S.P., Besednova N.N. Morphofunctional changes of dendritic cells induced by sulfated polysaccharides of brown algae. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2017; 63 (1): 39–46. doi: <https://doi.org/10.18097/PBMC20176301039>. (In Russian)]
11. Имбс Т.И., Харламенко В.И., Звягинцева Т.Н. Оптимизация процесса экстракции фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*. // *Химия растительного сырья*. 2012; 1: 143–147. [Imbs T.I., Kharlamenko V.I., Zvyagintseva T.N. Optimizatsiya protsessa ehkstratsii fukoidana iz

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Е. В. Матосова — разработка модели, анализ и интерпретация результатов, написание текста, финальное утверждение рукописи; Н. Н. Беседнова — разработка концепции исследования, редактирование текста, финальное утверждение рукописи; М. И. Кусайкин — интерпретация результатов, написание фрагмента текста, финальное редактирование текста, финальное утверждение рукописи; Б. Г. Андрюков — интерпретация результатов, редактирование текста; И. Д. Макаренкова — интерпретация результатов, написание фрагмента текста; М. Ю. Щелканов — разработка концепции исследования, финальное утверждение рукописи; И. Н. Ляпун, М. П. Бынина, Т. Н. Звягинцева — выполнение исследования; С. П. Ермакова — редактирование текста, финальное утверждение рукописи.

- buroj vodorosli *Fucus evanescens*. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2012; 1: 143–147. (in Russian)]
12. Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства. Под ред. Н. Н. Беседновой, Т. Н. Звягинцевой. Владивосток: Дальнаука. 2014. [Fukoidany — sul'fatirovannye polisakharidy burykh vodoroslej. *Struktura, fermentativnaya transformatsiya i biologicheskie svoystva*. / N. N. Besednova, T. N. Zvyagintseva (eds). Vladivostok: Dal'nauka; 2014. (in Russian)]
13. Беседнова Н.Н. Морские гидробионты — потенциальные источники лекарств. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014; 57 (3): 4–10. [Besednova N.N. Sea hydrobionts — potential sources of drugs. *Health. Medical Ecology. Science*. 2014; 57 (3): 4–10. (in Russian)]
14. Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю., Исаков В.В., Глазунов В.П., Звягинцева Т.Н. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика. *Химия растительного сырья*. 2004; 3: 15–24. [Urvantseva A.M., Bakunina I.Yu., Kim N.Yu., Isakov V.V., Glazunov V.P., Zvyagintseva T.N. Vydelenie ochishchenogo fukoidana iz prirodnogo kompleksa s polifenolami i ego kharakteristika. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2004; 3: 15–24. (in Russian)]
15. Kusakyan M.I., Chizhov A.O., Grachev A.A., Alekseeva S.A., Bakunina I.Yu., Nedashkovskaya O.I. et al. A comparative study of specificity of fucoidanases from marine microorganisms and invertebrates. *J Appl Phycol*. 2006; 18 (3–5): 369–373.
16. Sternberg C., Bjarnsholt T., Shirliff M. Methods for dynamic investigations of surface-attached *in vitro* bacterial and fungal biofilms. *Methods Mol Biol*. 2014; 1147: 3–22. doi: [10.1007/978-1-4939-0467-9_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9_1).
17. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998; 28 (3): 449–461. doi: [10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x).
18. Ommen P., Zobek N., Meyer R.L. Quantification of biofilm biomass by staining Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. *J Microbiol Methods*. 2017; 141: 87–89. doi: [10.1016/j.mimet.2017.08.003](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.003).
19. Usovteva R., Shevchenko N., Malyarenko O., Anastyuk S., Kasprik A., Zvyagintsev N., Ermakova S. Fucoidans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: Structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity *in vitro*. *Carbohydr Polym*. 2019; 221: 157–165. doi: [10.1016/j.carbpol.2019.05.079](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.079).
20. Zvyagintsev N., Usovteva R., Shevchenko N., Surits V., Imbs T., Malyarenko O., Besednova N., Ivanushko L., Ermakova S. Structural diversity of fucoidans and their radioprotective effect. *Carbohydr Polym*. 2021; 273: 118551. doi: [10.1016/j.carbpol.2021.118551](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118551).
21. Rasin A., Shevchenko N., Silchenko A., Kusakyan M., Likhatskaya G., Zvyagintseva T., Ermakova S. Relationship between the structure of a highly regular fucoidan from *Fucus evanescens* and its ability to form nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2021; 185: 679–687. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2021.06.180](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.180).

22. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15 (2): 167–193.
23. Беседнова Н.Н., Макаренко И.Д., Звягинцева Т.Н., Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С. Ингибирующее действие полисахаридов морских гидробионтов на формирование биоплёнок. Антибиотики и химиотер. 2016; 61 (9–10): 64–73. [Besednova N.N., Makarenkova I.D., Zvyagintseva T.N., Kuznetsova T.A., Zaporozhets T.S. Inhibitory effect of polysaccharides of marine hydrobionts on biofilm formation. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2016; 61 (9–10): 64–73. (in Russian)]
24. Busetti A., Thompson T.P., Tegazzini D., Megaw J., Maggs C.A., Gilmore B.F. Antibiofilm activity of the brown alga *Halidrys siliquosa* against clinically relevant human pathogens. *Mar Drugs*. 2015; 13 (6): 3581–3605. doi: 10.3390/md13063581.
25. Запорожец Т.С., Макаренко И.Д., Бакунина И.Ю., Бурцева Ю.В., Кусайкин М.И., Балабанова Л.А. и др. Ингибирование адгезии *C. diphtheriae* к буккальному эпителию человека гликозид гидролазами из морских гидробионтов. Биомедицинская химия. 2010; 56 (3): 350–358. [Zaporozhets T.S., Makarenkova I.D., Bakunina I.Y., Burtseva Y.V., Kusaikin M.I., Balabanova L.A., et al. Inhibition of adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to human buccal epithelium by glycoside hydrolases of marine hydrobionts. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2010; 56 (3): 350–358. (in Russian)]
26. Marudhupandi T., Kumar A. Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. *Int Current Pharmaceutical J*. 2013; 10 (2): 156–158.
27. Vasconcelos A.A., Pomin V.H. Marine Carbohydrate-Based Compounds with Medicinal Properties. *Mar Drugs*. 2018; 16 (7): 233. doi: 10.3390/md16070233.

Информация об авторах

Матосова Екатерина Владимировна — научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9968-3347

Беседнова Наталия Николаевна — д. м. н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2760-9778

Кусайкин Михаил Игоревич — д. б. н., заместитель директора по научным вопросам, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Андрюков Борис Георгиевич — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

Макаренко Илона Дамировна — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6450-840X

Щелканов Михаил Юрьевич — д. б. н., директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, ORCID ID: 0000-0001-8610-7623

Ляпун Ирина Николаевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5290-3864

Бынина Марина Павловна — младший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8255-328X

Ермакова Светлана Павловна — д. х. н., руководитель лаборатории химии ферментов, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5905-2046

Звягинцева Татьяна Николаевна — д. х. н., главный научный сотрудник лаборатории химии ферментов, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

About the authors

Ekaterina V. Matosova — researcher at the Laboratory of Intestinal Infections, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9968-3347

Natalia N. Besednova — D. Sc. in Medicine, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2760-9778

Mikhail I. Kusaikin — D. Sc. in Biology, Deputy Director for Scientific Affairs, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Boris G. Andryukov — D. Sc. in Medicine, Leading Researcher at the Laboratory of Intestinal Infections, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia

Ilona D. Makarenkova — D. Sc. in Medicine, Leading Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6450-840X

Mikhail Yu. Shchelkanov — D. Sc. in Biology, Director of the G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8610-7623

Irina N. Lyapun — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Pathomorphology, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5290-3864

Marina P. Bynina — Junior Researcher at the Laboratory of Intestinal Infections, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8255-328X

Svetlana P. Ermakova — D. Sc. in Chemistry, Head of the Laboratory of Enzyme Chemistry, G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5905-2046

Tatyana N. Zvyagintseva — D. Sc. in Chemistry, Chief Researcher at the Laboratory of Enzyme Chemistry, G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia