

Курский государственный университет

На правах рукописи



Сычев Александр Владимирович

**Количественный анализ характеристик
бактериального роста на основе
колориметрических данных**

1.5.2 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель

д. ф.-м. н., доц.

Е.Б. Постников

Саратов – 2024

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Современные подходы к экспериментальному определению популяционной динамики микроорганизмов . . .	11
1.1. Введение	11
1.2. Фотометрические и флуориметрические методы анализа роста микробных популяций	13
1.3. Анализ жизнедеятельности микроорганизмов с применением резазурина	17
1.4. Выводы по главе	24
Глава 2. Взаимосвязь концентрационных и колориметрических характеристик индикатора, используемого в резазуриновом тесте	25
2.1. Введение	25
2.2. Получение спектров поглощения системы резазуринов – резорурфин	27
2.3. Обработка спектров поглощения: динамика концентраций реагентов	32
2.4. Обработка цветных изображений и соответствие между колориметрической и концентрационной зависимостями	35
2.5. Выводы по главе	41
Глава 3. Колориметрический и фотометрический анализ воздействия минимальной ингибирующей концентрации лекарственных препаратов на микобактерии	43
3.1. Введение	43
3.2. Колориметрический подход к определению МИК	44

3.3.	Применение портативного микробиологического анализатора для определения МИК	60
3.4.	Выводы по главе	66
Глава 4. Определение динамики популяционного роста микрочультур с использованием колориметрического метода		
4.1.	Введение	68
4.2.	Модель связанной популяционной и химической кинетики .	69
4.3.	Анализ индикации экспериментального роста культуры лактобактерий в контексте популяционно-химической модели .	76
4.4.	Исследование динамики роста микобактериальной культуры	86
4.5.	Выводы по главе	97
Список литературы		101

Введение

Актуальность темы исследования. Колориметрические тесты, базирующиеся на изменении цвета индикаторных сред, как отклика на процессы жизнедеятельности клеток, относятся к числу базовых методов современного микробиологического анализа¹. Среди них, в качестве наиболее надежного, выделяется метод, основанный на конверсии синего нефлуоресцентного красителя – резазурина (известен также под коммерческим названием Alamar Blue) в розовый флуоресцентный резорурфин, что позволяет использовать как визуальный, так и спектрофотометрический метод регистрации. При этом, несмотря на продолжительную историю использования резорурфина на основе эмпирических наблюдений, биохимические механизмы его редукции в жизнеспособной клетке были выявлены не столь давно². Вследствие этого, в настоящее время является актуальной задача³ исследования более широкого комплекса взаимосвязанных процессов, включающих в себя иерархию редокс-механизмов на клеточном, популяционном и макроскопическом спектрохимическом уровнях.

В частности, в современной научной литературе активно обсуждается вопрос о принципиальной возможности установить количественную (а не качественную визуальную, принятую в настоящее время) зависимость между динамическими характеристиками роста микробных культур, включая их отклик на лекарственные препараты, подавляющие рост микроорганизмов, и количественными характеристиками индикатора резазуринового теста. Разработка подобных методов является актуальной в контексте создания мобильных систем быстрого скрининга роста микроорганизмов

¹ Präbst K et al. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and Resazurin. In *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* / Gilbert D.F. Friedrich O., Eds.; Humana Press: New York, pp. 1–17.

² O'Brien J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 5421-5426.

³ Lavogina D. et al. Revisiting the resazurin-based sensing of cellular viability: Widening the application horizon. *Biosensors*. 2022. V. 12: 196.

методами анализа цифровых фотоизображений⁴. При этом существует запрос на разработку новых методов постобработки соответствующих файлов, расширяющих возможности идентификации целевых биофизических параметров за счет более эффективного использования информации, кодирующей цветовой отклик.

Одновременно с этим следует отметить, что индикаторные методы характеристики роста микробных культур, в отличие от прямого микроскопического подсчета клеток или колониеобразующих единиц, относятся к числу косвенных. Регистрируемые наблюдателем данные обусловлены целым рядом взаимосвязанных процессов: физиологических, связанных с ростом и делением клеток, биофизических и биохимических, связанных с транспортом индикаторных веществ в среде и клетке, а также редокс-механизмами в последней, обуславливающими целевой переход восстановления индикатора, физико-химических и оптических, отвечающих за скорость протекания химической реакции и наблюдаемый целевой цветовой переход. Вследствие этого необходим учет всего перечисленного комплекса процессов для установления взаимосвязи между данными экспериментально-регистрируемой кривой роста индикаторного отклика и вызывающей ее истинной популяционно-динамической зависимостью⁵.

Цели и задачи диссертационной работы. *Цель работы* заключается в разработке методов количественной индикации и характеристики роста микробных популяций на основе колориметрических измерений в ходе резазуриного теста.

Для достижения поставленной цели определены и сформулированы

⁴ de Santana P.C., Lourenco F.R. A smartphone-based bioassay for determining relative potency estimated from sigmoidal-response curves and respective measurement uncertainty. *Microchem. J.* 2020. V. 154:104626; Popova A.A. et al. Simple assessment of viability in 2D and 3D cell microarrays using single step digital imaging. *SLAS Technol.* 2022. V. 27. P. 44–53.

⁵ Ghenu A.H., Marrec L., Bank C. Challenges and pitfalls of inferring microbial growth rates from lab cultures. *Front. Ecol. Evol.* 2024. V. 11: 1313500.

основные задачи диссертационного исследования:

1. Установить соответствие между координатами цветовых пространств и интенсивностью флуоресценции индикаторов популяционного роста жизнеспособных микробных культур.
2. Разработать методику работы с портативным микробиологическим анализатором, использующим одноканальную фотометрическую регистрацию, для определения характеристик кривых “доза–эффект” для антибактериальных препаратов, действующих на культуру *M. tuberculosis*, на основе колориметрических и фотометрических данных резазуринового теста.
3. Применить разработанную методику к задаче определения минимальных ингибирующих концентраций для новых соединений нитрофуранового ряда, рассматриваемых как кандидаты в препараты с антимикобактериальной активностью.
4. Исследовать особенности физико-химических механизмов, обуславливающих характер детектируемых в эксперименте кривых роста микробных культур в жидких индикаторных средах.

Научная новизна работы состоит в следующем:

1. Впервые установлено, что накопление резорурфина за счет дыхательной активности медленно растущей культуры *M. tuberculosis* в условиях протокола резазуринового теста в микропланшетах (РЕМА) соответствует линейному росту интенсивности канала a^* цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$, что позволяет проводить количественную оценку жизнеспособности микобактериальной культуры на основе колориметрических измерений.
2. Разработан новый количественный метод характеристики роста микроорганизмов при помощи портативного микробиологического анализатора, основанный на согласовании интенсивности светопропуска-

ния с колориметрическими характеристиками резазуриновой индикаторной среды и цветовой фильтрации осветителя.

3. С использованием разработанного количественного колориметрического метода получены новые данные об активности в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью четырех новых перспективных препаратов нитрофуранового ряда и определены соответствующие минимальные ингибирующие концентрации.
4. Выявлено и обосновано явление спонтанной синхронизации роста и деления клеток *M. tuberculosis*, растущих в жидких культурных средах ВАСТЕС и Middlebrook 7H9.
5. Впервые экспериментально подтверждена валидность новой модели построения кривых регистрируемой динамики, соответствующей популяционному росту микробных культур в индикаторных средах, учитывающей связанные процессы популяционной динамики и биохимической кинетики.

Теоретическая и практическая значимость. *Теоретическая значимость* работы состоит в (i) развитии подхода, дающего возможность количественной характеристики роста культур микроорганизмов на базе колориметрической индикации в ходе резазуринового теста, который до настоящего времени рассматривался как качественный критерий; (ii) выявлении на основе разработанного метода и альтернативного ему количественного флуориметрического подхода особенностей интерпретации оптических кривых отклика на дыхательную активность микроорганизмов – возникновения нестационарной спонтанной синхронизации в колониеобразующих культурах *M. tuberculosis* при их больших начальных концентрациях в пробе и специфики количественного учета соответствия масштабов времени клеточного деления и кинетических констант химической реакции, протекающей в индикаторной среде.

Практическая значимость работы состоит прежде всего в разработке практических методик исследования роста культур *M. tuberculosis* и контроля их отклика на антимикобактериальные препараты, в том числе в ходе разработки новых лекарственных средств, действующих на антибиотикорезистентные штаммы, при помощи портативного микробиологического анализатора и методики колориметрического анализа фотографий микробиологических планшетов в ходе резазуринового теста. Данные подходы дают альтернативу использованию дорогостоящего флуориметрического оборудования, повышая тем самым доступность соответствующих тестов для системы здравоохранения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наличие функциональной зависимости между концентрацией резорфина, производящегося вследствие дыхательной активности микроорганизмов в присутствии индикатора – резазурина, и изменением интенсивности канала a^* цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$ позволяет количественно характеризовать процессы жизнедеятельности и роста микробных культур.
2. Колориметрические измерения предоставляют возможность определения основных количественных характеристик кривых “доза–эффект” для отклика культуры *Mycobacterium tuberculosis* на антибактериальные лекарственные препараты.
3. Микобактериальная культура, растущая в жидкой среде, демонстрирует явление синхронизации роста и деления клеток, отражающееся в специфическом ступенчатом характере кривых отклика индикатора роста, выявленного при двух независимых подходах: флуоресцентном анализе с использованием системы ВАСТЕС MGIT 960 и фотометрическом, с использованием портативного микробиологического анализатора в микробиологическом планшете с применением резазуринового теста.

4. Определение динамики роста микробных популяций по экспериментальным данным отклика индикаторных сред на жизнедеятельность микроорганизмов должно учитывать связанные процессы кинетики популяционного роста и кинетики сопутствующих химических реакций на основе введения поправок к классическим моделям популяционного роста, учитывающих протекающие химические процессы.

Апробация результатов. Основные результаты докладывались автором лично на научных конференциях:

- XXV Saratov Fall Meeting 2021 (27.09-1.10.2021, Саратов, Россия);
- 13th International Conference Dynamical Systems Applied to Biology and Natural Sciences (DSABNS) (8-11.02.2022, Bilbao, Spain [online]);
- VII Съезд биофизиков России (17-23.04.2023, Краснодар, Россия)
- AIMECS 2023. 14th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (25-28.06.2023, Seoul, South Korea);
- XII-й Конгресс «Национальной Ассоциации Фтизиатров», посвященный 100-летию со дня основания Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии (20-23.11.2023, Санкт-Петербург, Россия);
- TransMat 2K24: International Conference on Translational Materials for Sustainable Technology (1-4.02.2024, Varanasi, India).
- IUPAB2024: 21st Congress of the International Union for Pure and Applied Biophysics & 62nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (24-28.06.2024, Kyoto, Japan).

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 14 работах, из них: 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, 1 статья в материалах международной научной конференции, проиндексированная Scopus, 1 свидетельство о регистрации программ для ЭВМ, 4 патента РФ и 5 тезисов докладов.

Личный вклад автора состоит в следующем: все экспериментальные данные связанные с колориметрической индикацией роста культур микроорганизмов получены лично автором, равно как и их обработка с выявлением особенностей соответствующей динамики, модификация и калибровка портативного микробиологического анализатора; в части работы, связанной с определением минимальной ингибирующей концентрации новых антитуберкулезных препаратов, фотоизображения планшетов после проведения резазуринового теста предоставлены специалистами СПб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ (СПб НИИФ), их обработка, анализ данных и интерпретация выполнены автором; данные эксперимента с использованием ВАСТЕС MGIT 960 также предоставлены СПб НИИФ и использованы автором для верификации модели связанной химико-биофизической динамики индикатора роста. Постановка конкретных задач исследования и план их реализации разрабатывались автором совместно с научным руководителем и соавторами опубликованных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения и библиографии. Общий объем диссертации 120 странице, из них 100 страница текста, включая 33 рисунка и 3 таблицы. Библиография включает 149 наименований на 20 страницах.

Современные подходы к экспериментальному определению популяционной динамики микроорганизмов

1.1. Введение

Понимание относительной значимости каждого популяционного процесса для формирования специфической динамики отдельных микроорганизмов необходимо для мониторинга метаболических функций, жизнеспособности и пролиферации клеток [1, 2]. Помимо классических подходов, связанных с непосредственным микроскопическим подсчетом количества клеток или колониеобразующих единиц, а также оптической плотности среды, изменяющейся из-за роста концентрации суспензии микроорганизмов в ней, современные методы, работающие с живыми клеточными культурами в жидкой среде и нацеленные на их мониторинг в живом состоянии, обращаются к изучению отклика индикаторных сред (например, изменение цвета, флуоресценции или люминесценции) на активность ферментов живущей клетки (в частности, в ходе деятельности дыхательной цепи аэробных микроорганизмов), производство АТФ, истощение субстрата и содержание кислорода в среде.

Особое внимание привлекает разработка количественных методов, характеризующих популяционную динамику патогенов и их отклик на лекарственные препараты, в том числе с точки зрения разработки новых, более эффективно действующих веществ [3, 4]. К числу микроорганизмов, привлекающих особое внимание относятся микобактерии (*Mycobacterium*), в частности – микобактерия туберкулеза *M. tuberculosis*, так как туберку-

лез является одним из наиболее распространенных тяжелых заболеваний, представляющих опасность для здоровья населения во всемирном масштабе [5, 6].

При этом многие штаммы микобактерий, как и прочие микроорганизмы, со временем вырабатывают множественную резистентность к различным видам лекарственных препаратов [7, 8, 9, 10, 11]. Согласно Global Tuberculosis Report 2023 Всемирной организации здравоохранения [12], количество случаев с резистентностью к лекарствам первой линии (например, изониазиду и рифампицину), а также с множественной лекарственной устойчивостью составляет около 3.3 % среди пациентов с первично диагностированным туберкулезом и достигает 17 % среди людей с повторным заболеванием. Таким образом, разработка количественных методов отслеживания процессов жизнедеятельности микобактерий и изменение их популяционной динамики при воздействии ингибирующими препаратами, а также получение кривых “доза-отклик” на лекарственное воздействие является актуальной задачей для сопровождения синтеза новых антимикобактериальных препаратов [13, 14, 15].

Одновременно следует отметить, что микобактерии являются одним из наиболее сложных объектов среди микроорганизмов с точки зрения физиологии и биофизики протекающих процессов [16]. Это связано, в частности, со сложной, с биохимической и физико-реологической точки зрения, клеточной стенкой, существенно затрудняющей транспорт и реакционную способность действующих веществ, а также отвечающей за особенности физического роста и деления микобактериальных клеток [17, 18], существенной зависимостью периода удвоения от условий выращивания в жидкой среде [19], активным колониобразованием, в отношении которого высказываются определенные гипотезы о важности учета такого неравновесного процесса как чувство кворума (quorum sensing) [20]. С точки зрения популяционной динамики, это пробуждает новый интерес к эффектам синхро-

низации деления микобактериальной культуры, впервые обнаруженных по данным непосредственного подсчета количества жизнеспособных единиц (клеток или колоний) в ранних работах [21]. Но несмотря на ряд еще не получивших полного объяснения механизмов, эти эффекты привлекают внимание, в том числе, с точки зрения перспектив антибактериальных воздействий [22].

Таким образом, существующие цели фундаментальной микробиологии ставят ряд задач разработки физических и физико-химических подходов, которые, будучи рассматриваемые в комплексе с соответствующими биологическими механизмами, формируют формируют актуальную биофизическую проблему [23, 24].

1.2. Фотометрические и флуориметрические методы анализа роста микробных популяций

1.2.1. Фотометрия оптической плотности

Фотометрический метод характеристики роста микроорганизмов в жидкой среде (измерение (как правило, на длине волны 600 нм) оптической плотности (OD₆₀₀) культурной среды, содержащей суспензию микроорганизмов, и изменяющейся в силу увеличения концентрации делящихся клеток) относится к числу классических методов микробиологических исследований, разработанных на заре количественной микробиологии [25].

В настоящее время соответствующие протоколы исследования и биофизические модели в целом достаточно хорошо обоснованы и стандартизированы [23, 26].

Вместе с тем, в современной литературе отмечается ряд ограничений данного метода. Прежде всего, это касается принципиального допущения, на котором основывается метод, – прямая пропорциональность оптической

плотности и плотности популяции в среде. Ряд современных детальных исследований показывает [27, 28], что она выполняется в ограниченном интервале условий, который может зависеть от объема, в котором, проводится эксперимент, геометрических характеристик и размеров микроорганизмов, влияющих на прохождение светового пучка (рассеяние и поглощение света), в особенности при больших плотностях популяций. При этих условиях интерпретация результатов требует аккуратной калибровки оптического оборудования. В частности, культура микобактерий *M. tuberculosis*, склонная к образованию агрегатов разного масштаба, известна [29] как пример, который может проявлять такую существенно нелинейную зависимость между результатами прямого подсчета колониеобразующих единиц, мутности среды, измеряемой нефелометром, и OD600. Также следует отметить, что достаточно долгое воздействие света в определенных спектральных окнах на культуру микобактерий может приводить к их динамической инактивации за счет образования активной формы внутриклеточного свободного кислорода, образующегося в ходе реакций с эндогенными порфиринами [30, 31, 32].

При этом измерение оптической плотности не различает живые (активные), жизнеспособные (но неактивные) клетки и погибшие микроорганизмы, так как наличие любых из них одинаково сказывается на оптических свойствах раствора, в котором они находятся. В силу этого, более надежными методами количественной характеристики растущих микробных культур представляются те, принцип которых основан на учете метаболических процессов, сопровождающих жизнедеятельность микроорганизмов.

1.2.2. Флуориметрические методы, основанные на регистрации изменения концентрации кислорода в среде за счет дыхания аэробных микроорганизмов

Среди методов, основанных на оптической индикации химических реакций, сопровождающихся флуоресценцией реагентов, особую важность имеют инвазивные подходы, регистрирующие изменения биохимического состава внутриклеточной или же культурной среды в результате метаболических процессов в клетках в процессе их роста и пролиферации [33, 34, 35]. Существенным преимуществом таких подходов является то, что они учитывают только количество жизнеспособных микроорганизмов, что невозможно для методов, использующих измерение оптической плотности.

Наиболее надежным процессом для таких исследований является бактериальное дыхание. Поиск методов, коррелирующих между содержанием кислорода в среде, где растут бактерии, и характеристиками их жизнедеятельности, был начат на заре количественной экспериментальной микробиологии [36] и продолжается до настоящего времени, включая такие современные задачи, как изучение лекарственной чувствительности и резистентности [37]. В основе такого подхода лежат две причины: i) потребление кислорода при дыхании является прямым маркером различных метаболических процессов в живых и делящихся бактериях [38, 39]; ii) динамическое изменение концентрации растворенного в жидкой среде кислорода может быть точно и эффективно обнаружено, зарегистрировано и количественно оценено методами аналитической химии. Это возможно благодаря существованию целого ряда нейтральных химических веществ, фотофизические свойства которых резко изменяются в зависимости от содержания кислорода, растворенного в исследуемой среде. Этот подход находит применение в широком спектре систем [40, 41, 42].

Одним из наиболее известных и широко распространенных в насто-



Рис. 1.1. Система регистрации микобактериального роста ВАСТЕС MGIT 960 и используемые в ее работе флаконы с жидкой средой (в нижней части виден индикаторный элемент). Источник – фото с сайта производителя (Becton Dickinson, США): www.bd.com.

ящее время методов, в качестве стандарта в области исследований, связанных с бактериальными культурами *M. tuberculosis*, является система ВАСТЕС MGIT 960 [43, 44, 45], см. рис. 1.1.

Принцип его работы можно кратко описать следующим образом: флакон – индикатор роста микобактерий (MGIT – Mycobacterial Growth Indicator Tube) содержит аликвоту среды Middlebrook7H9, поддерживающей рост микобактерий, и силикатную подложку, пропитанную дихлоридным комплексом трис(4,7-дифенил-1,10-фенантролин)рутения(II), который представляет собой сенсор гашения флуоресценции. Активность этого флуорохрома гасится кислородом, растворенным в среде, наполняющей флакон. В процессе роста бактерий растворенный кислород расходуется и впоследствии замещается углекислым газом. В результате ингибирование флуорохрома свободным кислородом постепенно уменьшается, и его флуоресценция, в ответ на ультрафиолетовое освещение, может быть зафиксирована сенсором ВАСТЕС. Данная процедура выполняется ВАСТЕС MGIT 960 в автоматическом режиме с шагом по времени один час. Однако в обычных биомедицинских исследованиях, отраженных в литературе, ВАСТЕС MGIT 960 как правило используется только для принятия бинарного решения: преодолевает ли интенсивность флуоресценции некоторую эмпирически заданную границу (это свидетельствует о растущей культуре) или

нет (это интерпретируется как не растущая культура). Кроме того, может быть учтено время, необходимое для преодоления указанной границы.

В то же время ВАСТЕС MGIT 960 способен предоставить гораздо больше информации, которая может быть проанализирована и потенциально может дать важные биофизические и биохимические представления, если принять во внимание значительные ряды данных с малым временным разрешением. В частности, известен ряд работ, выявляющих пропорциональность указанных единиц роста жизнеспособной бактериальной популяции [46, 47]. Вместе с тем, анализ полной кривой флуоресценции, форма которой определяется как биохимическими процессами, связанными с дыханием, так и физическими процессами транспорта кислорода, а также химической кинетикой гашения флуоресценции [42, 48, 49] остается малоисследованной, как и сходные вопросы построения биофизических моделей динамики популяционного роста культур микроорганизмов при косвенных методах их регистрации.

1.3. Анализ жизнедеятельности микроорганизмов с применением резазурина

1.3.1. Общие сведения и механизм действия

Резазуриновый тест был впервые предложен Пешем и Зиммертом в 1928 году [50] для проверки качества молока на наличие бактериальной обсемененности. В данном применении в качестве дешевого и быстрого метода предварительного качественного анализа он активно применяется вплоть до настоящего времени [51] и, в частности, входит в число стандартных методов, рекомендованных Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединённых Наций (ФАО) [52] и российским ГОСТ 9225-84 “Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа”.

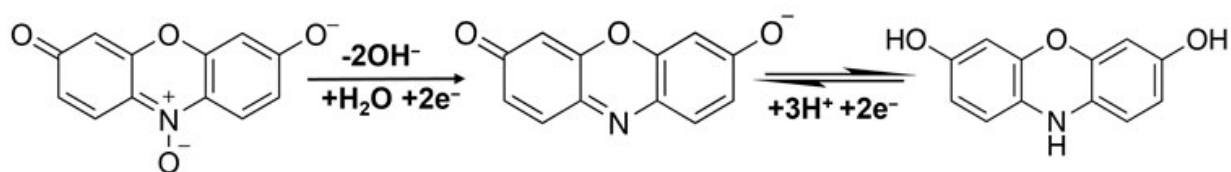


Рис. 1.2. Структурные формулы резазурина, резоруфина и дигидрорезоруфина и основной механизм восстановительно-окислительных процессов перехода между ними.

В дальнейшем данный подход было предложено использовать в качестве экспресс-теста на чувствительность к антибиотикам [53, 54, 55] и в настоящее время он стал одним из основных методов мониторинга жизнеспособности и метаболических функций клеток [56, 2], а также анализа пролиферации [57].

Принцип действия данного теста основан на восстановлении резазурина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксид; известен также под коммерческим названием Alamar Blue) – водорастворимого красителя (обычно в форме натриевой соли) до резоруфина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он), обладающего розовым цветом и при этом флуоресцирующим. В ходе продолжения реакции резоруфин далее может восстановиться до дигидрорезоруфина (7-гидрокси-1,2-дигидро-3Н-феноксазин-3-он). Структурные формулы данных веществ и химический механизм перехода между ними показан на рис. 1.2.

К настоящему времени установлена химическая кинетика данных реакций [58, 59], а также их электрохимические [60] и спектроскопические свойства [61].

При биохимическом восстановлении красителя используется реакция, в которой донором протонов могут выступать коферменты NADPH, FADH₂, FMNH₂, NADH и цитохромы. Методом конфокальной микроскопии было установлено [62] что реакция протекает в митохондриях и связана активностью дыхательной цепи. В связи с этим, флуоресценция резоруфина использовалась в том числе для оценки энергетических характеристик в

клетках разного типа [63] и специфики функционирования митохондрий в различных условиях [64]. Отслеживание флуоресценции, которая возрастает по мере происходящего процесса восстановления резазурина до резорурфина [65], использовалась для сравнения восстановительной способности разных типов клеток или воздействия растворенного вещества на конкретный тип клеток с точки зрения метаболической дисфункции или нарушения. Кроме того, проводились исследования клеточной цитотоксичности с использованием резазурина [62, 63, 66].

В исследовании [67] доказали, что резазурин не может быть восстановлен ни внеклеточными метаболитами в основной среде, ни на поверхности клетки. При этом окислительно-восстановительный процесс нуждается в дополнительных ферментах, таких как диафораза, действующая как переносчик электронов (катализатор). Такие ферменты не производятся и не присутствуют на поверхности клеток. Таким образом, восстановление резазурина происходит только внутриклеточно, а образовавшийся флуоресцентный розовый резорурфин способен диффундировать через клеточную мембрану в объем среды, где будет восстановлен внеклеточными метаболитами. Однако резорурфин также способен остаться внутри клетки, в таком случае он восстанавливается внутриклеточными метаболитами, а образующийся бесцветный нефлуоресцирующий дигидрорезорурфин затем диффундирует обратно через клеточную мембрану в объемную фазу. Водородный показатель среды также может влиять на процесс восстановления. При значении $\text{pH} > 4$ возможно образование дополнительного продукта – протонированного аниона резорурфина, а при $\text{pH} < 4$ равновесие системы смещается в сторону последовательной реакции образования дигидрорезорурфина [68].

1.3.2. Резазуриновый микротитровый анализ

Одним из наиболее важных приложений анализа с использованием резазурина является определение минимальной ингибирующей концентрации веществ, действующих на культуру микроорганизмов. Разработка последовательной процедуры использования серийного разведения лекарственного вещества и определения граничной концентрации, при которой исходный синий цвет резазуринового красителя не меняется, была начата в приложении к тестированию отклика различных штаммов микобактерий на лекарственные препараты первой линии в работе [69] и приняла современную форму в работе [70]. Результирующий подход – резазуриновый микротитровый анализ (REMA – resazurin microtiter assay) – в настоящее время является одним из стандартных методов микробиологического анализа [71, 57, 72].

В его визуальном варианте в питательную среду добавляются действующее вещество, концентрация которого изменяется в логарифмической шкале в колонках (или рядах) микробиологического планшета. Кроме того, оставляются колонки, предназначенные для контроля – без лекарственного препарата, без микроорганизмов, со 100-кратным разведением исходной культуры. Первая из трех демонстрирует положительный контроль – максимально возможный отклик, два последних – негативный контроль, позволяющий убедиться в отсутствии измерения цвета индикатора за время эксперимента. После добавления резазурина, спустя промежуток времени, сравнимый с характерным временем удвоения популяции производится наблюдение, рис. 1.3. Концентрация действующего вещества, начиная с которой видимое изменение цвета отсутствует, принимается как минимальная ингибирующая концентрация.

Соответствующий процесс может быть автоматизирован и сделан количественным с использованием флуорометрии. Это обуславливается тем, что резорурфин является сильно флуоресцирующим веществом (пики воз-

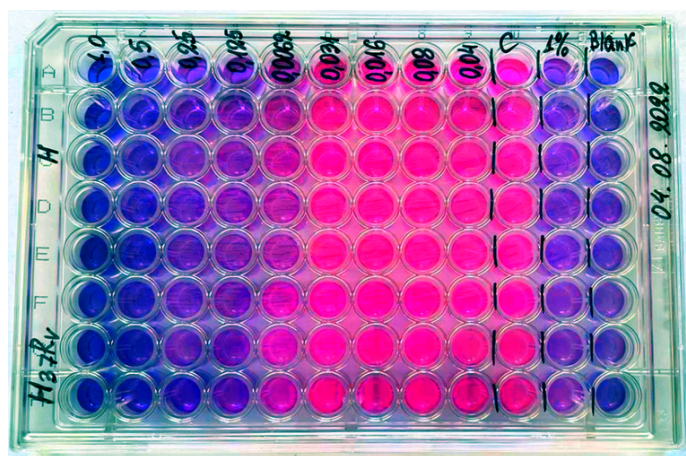


Рис. 1.3. Пример вида планшета при проведении резазуринового микротиревого теста (серийное разведение лекарственного препарата первой линии – изониазида, действующего на культуру *M. tuberculosis*, штамм H37Rv. Насыщенность фотографического изображения увеличена до 100%, чтобы подчеркнуть цветовую разницу.

буждения и эмиссии приходятся на 571 нм и 584 нм, соответственно) в отличие от нефлуоресцирующего резазурина. Для считывания данных об уровне флуоресценции в настоящее время активно применяются коммерческие планшетные ридеры, см. пример на рис. 1.4, которые позволяют как определять порог появления резорурфина в планшете в рамках теста REMA, так и проводить исследования его накопления с течением времени в экспериментах по исследованию временной динамики роста культур микроорганизмов.

Среди наиболее востребованных современных применений таких тест-систем можно назвать тестирование на чувствительность к антибиотикам и выявление резистентных бактерий [73], особенно для изучения лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* [74, 75, 76, 77, 78, 79], в экологических приложениях мониторинга гидрологической среды (например, взаимодействие воды и осадка и метаболическая активность микроорганизмов [80, 81], при этом изучено влияние условий хранения образцов и температурных режимов [82]), в экспериментах по радиобиологии [83], при цитотоксическом и цитостатическом исследовании клеток человека [84, 85] и др.

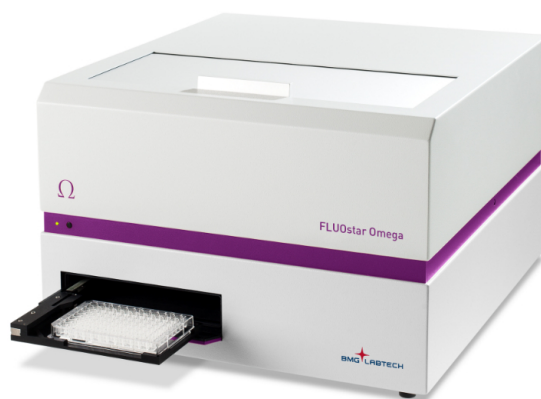


Рис. 1.4. Многофункциональный анализатор планшетного формата FLUOstar OPTIMA. Источник – фото с сайта производителя (BMG LABTECH GmbH, Германия): www.bmg-labtech.com/.

Тем не менее, особенность изменения цвета резазурина не остается в ряду только качественных методов скрининговых исследований, а все чаще применяется как количественный метод [86, 87, 88], что согласуется с растущим в последнее время интересом к колориметрии в аналитической химии [89] и биофизике [90].

Этот интерес подкрепляется целым рядом преимуществ, которыми обладает колориметрия по сравнению с чисто спектральными измерениями. Некоторые из них вытекают из технических ограничений области применимости методов, основанных на УФ-спектрофотометрии и регистрации флуоресценции: (i) известно, что флуоресценция резорурфина нелинейно зависит от концентрации резазурина и может даже гаситься его высокими концентрациями [91], и, кроме того, как утверждалось недавно [68], интенсивность регистрируемого сигнала может зависеть от присутствия вспомогательных соединений, то есть является приборно-зависимой, специфичной для конкретной аппаратуры; (ii) Метод УФ свободен от последних ограничений, однако на спектры поглощения также влияют высокие концентрации резазурина и свойства растворяющей среды [92, 93, 94].

Помимо этого, существуют также технические и финансовые причины, требующие поиска более дешевых и мобильных реализаций. В частно-

сти, стандартные спектрофотометрические микропланшетные ридеры достаточно дороги и громоздки. Это не позволяет широко использовать их в полевых исследованиях, например, для мониторинга окружающей среды в сельской местности, медицинских пунктах, расположенных вдали от крупных центров, а также в странах с низким уровнем дохода и, как следствие этого, невысокой распространенностью высокотехнологичного оборудования [73]. При этом, именно для таких регионов актуальна потребность в разработке дешевых и простых в исполнении наборов для тестирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза [95].

Следует заметить, что первые попытки использования количественного колориметрического анализа делались уже в ранние годы использования резазуринового теста. В частности проводилась корреляция между протабулированными цветами (такими как справочные атласы цветов системы Манселла [96, 97]) и бактериальной контаминацией молока [98, 99] и кленового сока [100], относительным содержанием резазурина и резорурфина в растворе [101].

Однако современная активизация интереса к количественной колориметрии тестов активности микроорганизмов связана с появлением цифровой фотографии и сканирующих аппаратов, которые дают изображение цветов индикаторной среды в количественной форме. Однако следует отметить, что различные использовавшиеся методы анализа цветовой информации [102, 103, 104, 105, 106] опирались в основном на несистематизированные эмпирические корреляции, учитывающие в основном первичные цветовые каналы получаемых изображений. Вследствие этого представленные результаты довольно противоречивы, существенно зависят от использованного оборудования и не дают четкой картины взаимосвязи с биохимическими и биофизическими закономерностями, установленными при использовании более разработанных экспериментальных техник (такие как спектрофотометрия и флуорометрия).

1.4. Выводы по главе

- Современные задачи фундаментальных исследований жизнедеятельности микроорганизмов и практические разработки лекарственных средств, прежде всего, антибактериальных, формируют запрос на разработку количественных, но относительно простых, доступных и мобильных средств анализа процессов популяционного роста.
- Одним из наиболее перспективных таких подходов является колориметрический, для которого, однако, современная научная литература показывает в основном качественные подходы и эмпирические зависимости для частных случаев, что свидетельствует о необходимости исследований, нацеленных на последовательную обоснованную интерпретацию регистрируемой динамики на основе комплексного изучения взаимосвязанных биофизических, химических и оптических процессов.
- Один из наиболее актуальных направлений практических приложений данного подхода представляется разработка методов характеристики действия антимикобактериальных препаратов, в особенности в условиях растущего количества лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, в том числе в процессе разработки новых лекарственных средств, нацеленных на преодоление этой проблемы.
- Микроорганизмы, склонные к активному колониеобразованию, такие как *M. tuberculosis*, проявляют нетривиальные динамические характеристики, такие как чувство кворума, синхронизация, и т.п., детали механизмов которых недостаточно исследованы к настоящему времени, что вызывает необходимость дальнейших соответствующих исследований.

Глава 2

Взаимосвязь концентрационных и колориметрических характеристик индикатора, используемого в резазуриновом тесте

2.1. Введение

Для исследования индикаторного отклика на жизнедеятельность и рост микробной культуры в жидкой среде следует в первую очередь провести количественное сопоставление концентраций реагентов резазуринового теста и колориметрических характеристик среды, выражающихся в изменении ее цвета.

Для решения данной задачи сложный биохимический путь восстановления индикатора был смоделирован использованием более простой, чем биохимический путь, химической реакцией между резазурином и гидразин гидратом, которая позволяет с высокой точностью зарегистрировать колориметрические изменения раствора в процессе перехода резазурина в восстановленную форму и не требует учета поведения дополнительных реакций и реагентов.

Так как гидразин гидрат представляет собой бесцветную прозрачную жидкость, то динамику концентраций субстрата (резазурина) и продукта (резорурфин) в ходе используемой реакции можно найти количественно с использованием УФ-спектрофотометрии, дополненной фотофиксацией кюветы непосредственно перед измерением спектральной и оптической плотности исследуемого раствора.

Еще одним преимуществом гидразин гидрата, в сравнении с другими

восстановителями, является медленная скорость реакции: так как в нашем случае было важно фиксировать изменения окраски исследуемого раствора, то реакция должна протекать медленно для фиксации необходимых характеристик. Также, в отличие от твердых растворителей, гидразин гидрат не требует катализатора, что существенно упрощает работу с ним.

В данной главе содержится описание методики УФ-спектрофотометрических исследований изменения концентрации резазурина и корреляция этих значений с количественным изменением интенсивности окраски раствора в ходе химического восстановления резазурина до резорурфина, что далее будет использовано в ходе проведения биофизических экспериментов и интерпретации их результатов.

2.1.1. Материалы

Основной раствор натриевой соли резазурина готовили следующим образом: навеску (0.055 ± 0.001) г натриевой соли резазурина (Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA), содержание красителя > 75 %) взвешивали при помощи аналитических весов Shinko Denshi HT – 120CE (погрешность взвешивания ± 0.0002 г), затем ее растворяли в кипяченой дистиллированной воде, которая была охлаждена до (25 ± 2) °C. Смесь тщательно перемешивали до полного растворения вещества. Рабочий раствор натриевой соли резазурина готовили разбавлением основного раствора кипяченой дистиллированной водой, охлажденной до температуры (25 ± 2) °C в соотношении 1 : 2.5. Массовая доля резазурина в рабочем растворе составляла 0.012 %. В качестве восстановителя для натриевой соли резазурина был выбран гидразин гидрат (гидразин 64%, Acros Organics).

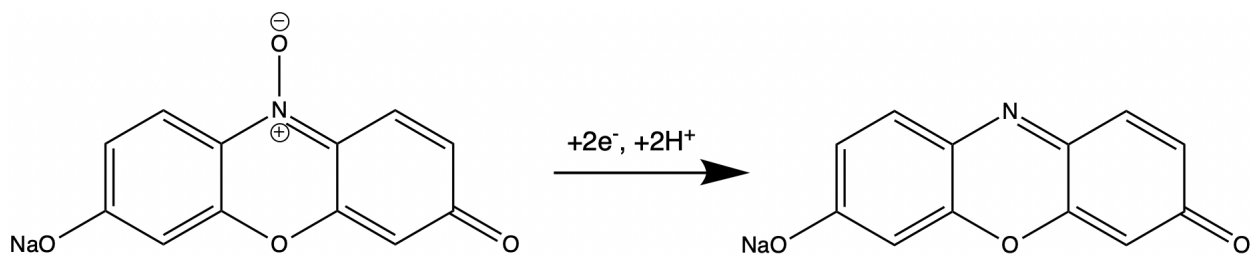


Рис. 2.1. Восстановление резазурина гидразин гидратом.

2.2. Получение спектров поглощения системы резазурин – резорурфин

Реакцию восстановления резазурина проводили путем добавления к рабочему раствору резазурина (100 мл) 100-кратного мольного избытка гидразингидрата (2 мл) (рис. 2.1). Для обеспечения равномерного распределения концентрации красителя и восстановителя по всему объему смесь непрерывно перемешивалась в течение всего эксперимента.

Для получения кривых поглощения использовали спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Киото, Япония), фотометрическая погрешность прибора равна 0.004 единицы поглощения в выбранном диапазоне. Прибор постоянно используется в лаборатории органического синтеза Курского государственного университета и поддерживается в калиброванном состоянии в соответствии с техническим заданием, поэтому специальная калибровка не проводилась. В качестве раствора сравнения использовалась дистиллированная вода.

Для проведения спектрофотометрического исследования была взята аликвота 50 мл. Оставшаяся часть смеси использовалась для определения рН раствора с помощью лабораторного иономера И-160МИ с электродной системой, состоящей из индикаторного стеклянного электрода и хлорсеребряного электрода в качестве электрода сравнения. На протяжении всего эксперимента смесь также перемешивалась для равномерного распределения концентраций в объеме. Полученные результаты измерений рН пред-

Таблица 2.1. Изменение рН смеси резазурина и гидразина

№	t, min	pH
1 (чистый водный раствор резазурина)	0	6.607
2(после добавления гидразина)	1	10.13
3	10	10.083
4	20	10.043
5	30	10.025
6	40	9.992
7	50	9.957
8	60	9.905
9	70	9.866

ставлены в таблице 2.1.

Спектральные измерения проводились с временным интервалом в 10 минут. На рис. 2.2 приведены характерные примеры изменения спектра: спектр исходной смеси резазурина и гидразина (0 мин), в котором основной пик определяется резазурином, и два спектра, записанные через 50 и 200 минут.

Полученный в начальный момент времени спектр является характеристическим спектром поглощения для чистого резазурина [93, 92, 107, 108, 109]. Изменение значения рН среды связано с уменьшением концентрации гидразина в исследуемой смеси, так как цвет этого раствора менялся сопоставимо цвету раствора, который использовался для спектрометрического анализа. При этом полученные спектрометрические данные согласуются с ранее описанными результатами при значениях рН ~ 10 [93, 92].

Для определения динамики изменения концентраций резазурина и резорфина были сняты кривые спектрального поглощения, с шагом 10 мин,

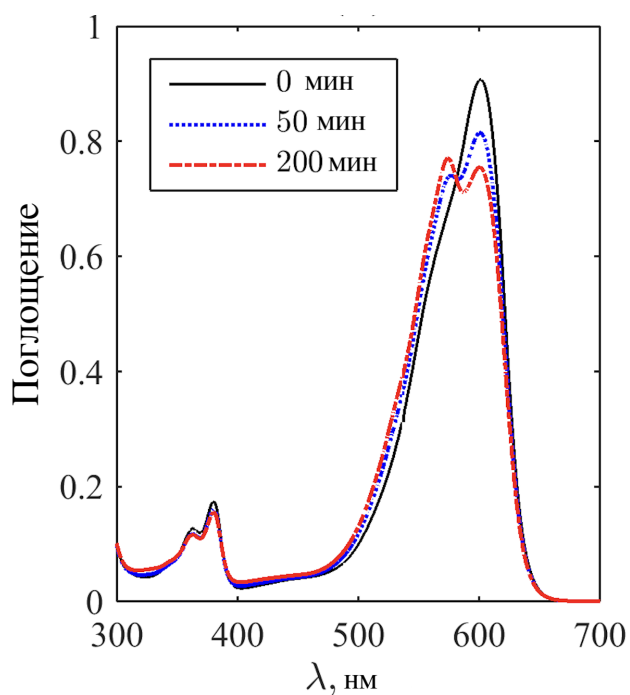


Рис. 2.2. Пример изменения спектра раствора гидразин гидрата и резазурина. Оба примера иллюстрируют развитие второго основного пика, связанного с появлением в смеси резорфуфина в результате реакции между резорфурином и гидразином.

на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения при 599 нм (резазурин) и 570 нм (резорурфин) в режиме записи спектрометра на двух заданных диапазонах поглощения. Соответствующие численные данные представлены в таблице 2.2, а их иллюстрация временной динамики на рис. 2.3.

При наложении двух кривых друг на друга видно падение значений оптической плотности резазурина, связанных с уменьшением его концентрации в растворе. Одновременно, значения оптической плотности резорурфина увеличиваются, однако не от нулевого начального значения, хотя в начальный момент времени резорурфин отсутствует в реакционной смеси. Это объясняется тем, что площади спектров достаточно широкие. В результате резазурин имеет 70% от максимума поглощения при длине волны 570 нм, а резорурфин - 7% от максимума поглощения при длине волны 599 нм. Данный факт согласуется с эталонными спектрами резазурина и резорурфина, представленными в базах данных ААТ Bioquest [108, 110].

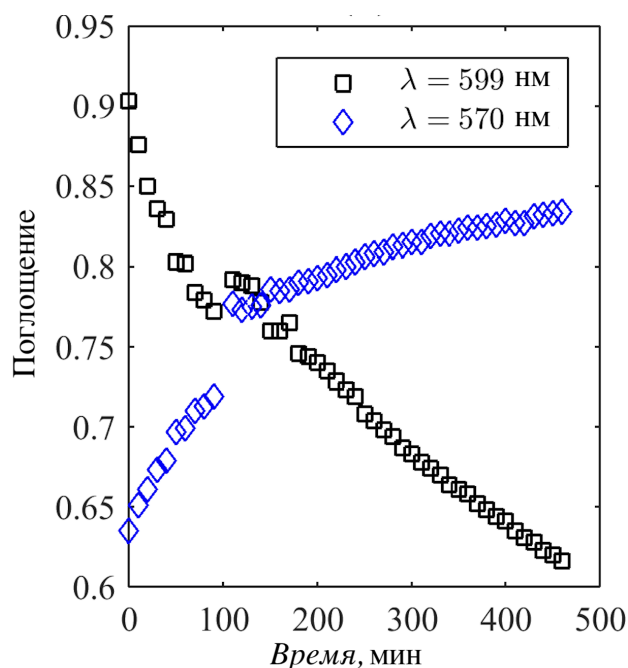


Рис. 2.3. Изменение интенсивности спектрального поглощения на длинах волн 599 нм (резазурин) и 570 нм (резорурфин). Погрешность прибора в данном случае сопоставима размеру маркеров

Кроме того, отмечается скачок на динамических кривых поглощения, соответствующий моменту времени $t = 100$ мин. Он сопровождается возникновением флуоресценции резорурфина, известной как свойство, широко используемое для его спектрофлуорометрической индикации в биофизических измерениях жизнедеятельности живых клеток. Гашение флуоресценции резорурфина в моменты времени до данного перехода может возникать за счет начальной избыточной концентрации резазурина. В работе [91] показано, что при соотношении резазурина и резорурфина более чем 20:1 в ходе ферментативной реакции гасится практически 90% флуоресценции. В нашем эксперименте это соотношение значительно ниже, чем может быть при использовании другого окислительно-восстановительного агента. Последнее неизбежно сказывается на изменении цвета индикатора и отслеживается с помощью УФ-спектрофотометрического анализа. Соответственно скачек оптической плотности в районе 100 минут связан с выравниванием спектров, которое происходит при выравнивании концентрации двух компо-

Таблица 2.2. Изменение значений поглощения смеси резазурина и гидразина в ходе реакции, преобразующей резазурин в резорурфин, на длинах волн, соответствующих спектральным максимумам резазурина и резорурфина.

t, min (Чистый)	599 нм	570 нм	t, min	599 нм	570 нм
	0.814	0.588			
0	0.903	0.635	240	0.719	0.803
10	0.876	10.083	250	0.708	0.806
20	0.85	10.043	260	0.704	0.808
30	0.836	10.025	270	0.698	0.809
40	0.829	9.992	280	0.694	0.812
50	0.803	9.957	290	0.687	0.813
60	0.802	9.905	300	0.683	0.815
70	0.784	9.866	310	0.678	0.815
80	0.779	0.713	320	0.674	0.819
90	0.772	0.719	330	0.67	0.82
110	0.792	0.777	340	0.664	0.82
120	0.79	0.773	350	0.661	0.822
130	0.788	0.775	360	0.658	0.824
140	0.778	0.776	370	0.652	0.824
150	0.76	0.786	380	0.648	0.825
160	0.76	0.785	390	0.644	0.826
170	0.765	0.786	400	0.641	0.828
180	0.746	0.79	410	0.635	0.827
190	0.744	0.791	420	0.631	0.827
210	0.735	0.795	440	0.623	0.832
220	0.729	0.798	450	0.62	0.833
230	0.723	0.8	460	0.616	0.834

нентов системы. Приблизительно в это же время цвет раствора начинает заметно изменяться от темно-синего до фиолетового, что также соответствует условиям применения данного красителя при реализации резазуринного теста в биомедицинских приложениях в варианте, основанном на визуальных наблюдениях.

2.3. Обработка спектров поглощения: динамика концентраций реагентов

Зарегистрированные значения поглощения на выбранных длинах волн Y_{599} и Y_{570} указывают не на прямые концентрации соединений (c_{Rz} – резазурин; c_{Rf} – резорурфин), а на их линейную комбинацию, представленную в стандартном виде [111] как

$$Y_{599} = c_{Rz} + 0.07c_{Rf}, \quad (2.1)$$

$$Y_{570} = 0.7c_{Rz} + c_{Rf}, \quad (2.2)$$

где оба спектра нормированы на единицу в своих максимумах.

Таким образом, решение системы (2.1) и (2.2) для каждого мгновенного значения регистрируемой спектральных интенсивностей дает искомый временной ход концентраций соединений:

$$c_{Rz}(t) = \frac{10}{951} (100Y_{599}(t) - 7Y_{570}(t)), \quad (2.3)$$

$$c_{Rf}(t) = \frac{10}{951} (100Y_{570}(t) - 70Y_{599}(t)). \quad (2.4)$$

Результирующие кривые, представляющие собой нормированные концентрации резазурина и резорурфина, рассчитанные по уравнениям (2.3) и (2.4) из УФ спектрометрических кривых, измеренных на линиях 570 нм и 599 нм, с учетом времени протекания реакции (с равномерным шагом по времени 10 мин), приведены на рис. 2.4. Они демонстрируют монотонное падение концентрации резазурина и рост концентрации резорурфина.

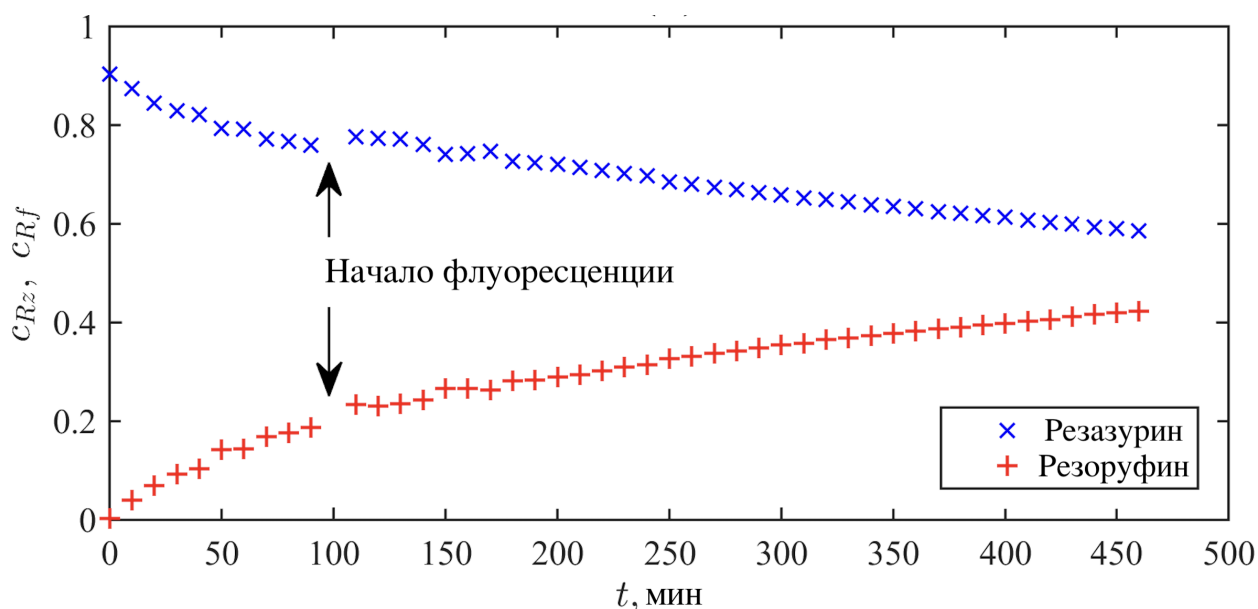


Рис. 2.4. Временная динамика нормированных концентраций резазурина и резорурфина в ходе реакции первого порядка с гидразином

Однако можно заметить мгновенный переход от быстрого спада/роста к более медленному (почти линейному). Интересно отметить, что первая стадия процесса не сопровождается флуоресценцией резорурфина, а изменение характера динамических кривых происходит точно в момент начала активной флуоресценции.

Об отсутствии флуоресценции резорурфина под действием избыточного количества резазурина уже сообщалось в литературе [112, 113]. Сложный характер химических процессов на первом этапе подтверждается графиком, представленным на рис. 2.5, на котором отражена сумма нормированных концентраций двух реагентов, где наступление флуоресценции выражается в виде четкого скачка между предыдущим и последующим маркерами.

При этом, суммарная концентрация для $t > 110$ мин практически постоянна и отклоняется от единицы не более чем на 1%, что находится в пределах ожидаемой экспериментальной погрешности измерений на основе УФ поглощения. Это полностью соответствует общепринятой кинетической

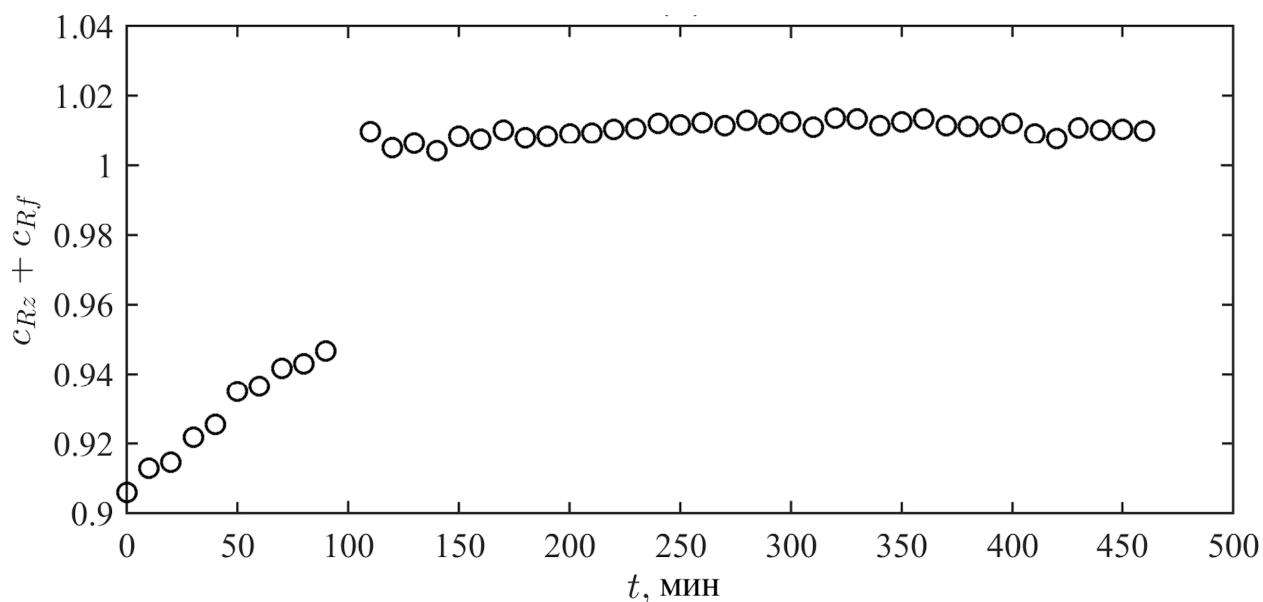


Рис. 2.5. Временная динамика суммарных нормированных концентраций резазурина и резорурфина.

модели восстановления резазурина [59], которая имеет общий вид



где R и $DhRf$ обозначают окислительно-восстановительный реагент и дигидрорезорурфин соответственно.

В условиях значительного избытка концентраций окислительно-восстановительных реагентов прямые реакции можно считать реакциями первого порядка с константами скорости $K_1 = k_1[R]$ and $K_2 = k_2[R]$. Кроме того, в рассматриваемой системе превращение резорурфина в дигидрорезорурфин (и его обратный аналог) протекает значительно медленнее, чем превращение резазурина в резорурфин, и на временном интервале эксперимента им можно пренебречь. В результате получаем

$$c_{Rz} = c_{Rz_0} \exp(-K_1 t), \quad c_{Rf} \approx c_{Rz_0} (1 - \exp(-K_1 t)), \quad (2.6)$$

т.е. $c_{Rz} + c_{Rf} = \text{const} \equiv c_{Rz_0}$. Последнее поведение при постоянной суммарной концентрации наблюдается на рис. 2.5 при $t > 100$ мин, когда выполняются обычные условия теста REMA (с флуоресценцией резорурфина).

Что касается первой стадии ($t < 100$ мин), то можно отметить две возможные причины поведения, формально не соответствующего основной реакционной схеме (2.5):

- гашение флуоресценции может свидетельствовать о более сложных межмолекулярных взаимодействиях, влияющих на величины УФ спектров для исследуемых длин волн;
- известный факт, что повышение pH приводит к изменению спектров как для резазурина, так и для резорурфина по сравнению с состоянием стандартных спектральных кривых (pH ÷ 6 – 7) [92].

Таким образом, избыток резазурина может приводить к занижению концентраций по уравнениям (2.1) и (2.2), как это видно из рис. 2.4 и 2.5. При увеличении концентрации резорурфина эти поправки компенсируют друг друга. Однако выявление химической подоплеки этого переходного процесса не входит в задачи настоящего исследования, но одновременно его существование дает дополнительный тест для установления соответствия между УФ и колориметрическими подходами.

2.4. Обработка цветных изображений и соответствие между колориметрической и концентрационной зависимостями

Последовательность фотографий кюветы, сделанных непосредственно перед каждым спектральным измерением, представлена на рис. 2.6.

Так как разрабатываемый подход к измерениям имеет целью использование колориметрической информации, то одной из главных задач был поиск наиболее адекватного цветового представления. Исходные изображения, получаемые при помощи цифровой камеры, записаны в формате цветового пространства RGB. Однако из научной литературы известно, что



Рис. 2.6. Серия фотографий кюветы со смесью резазурина и гидразина, сделанных в ходе их реакции с шагом 10 мин.

при использовании теста REMA существуют определенные проблемы, связанные со сложной характеристикой цвета в цветовом пространстве RGB по сравнению со спектрофотометрическими данными, что отмечалось как и в ранних исследованиях изображений, полученных с помощью цифрового сканера [102], так и в дальнейших разработках комбинированной числовой обработки многоканальных данных [103, 104].

Поэтому возникает обоснованное решение о переходе к альтернативным цветовым пространствам, лучше приспособленным к спектральным свойствам поглощения резазурина и резорурфина. Среди таких альтернатив особое внимание привлекает разработанное Международной комиссией по освещению (сокращенно CIE по французскому названию Commission Internationale de l'Éclairage) цветовое пространство CIE $L^*a^*b^*$ [114], основанное на тристимулах [86, 94]. Оно представляет собой независимую от способа получения изображения стандартную модель, которая отображает три распределения диапазонов длин волн в электромагнитном видимом спектре на переменные светлоты (L^*), красно-зеленого (a^*) и сине-желтого (b^*) цветовых каналов. Таким образом, каналы a^* и b^* напоминают цветовые изменения индикаторов резазурин-резорурфин. Кроме того, выделение канала L^* , полностью отделенного от тона и насыщенности, позволяет избежать дополнительной неопределенности, связанной с возможной вариацией освещенности кюветы при фотографировании в различные моменты времени (см. наличие ряда более темных изображений на рис. 2.6). Переход к анализу на плоскости (a^*, b^*) позволяет полностью сосредоточиться на изменении цветовых характеристик исследуемого раствора независимо

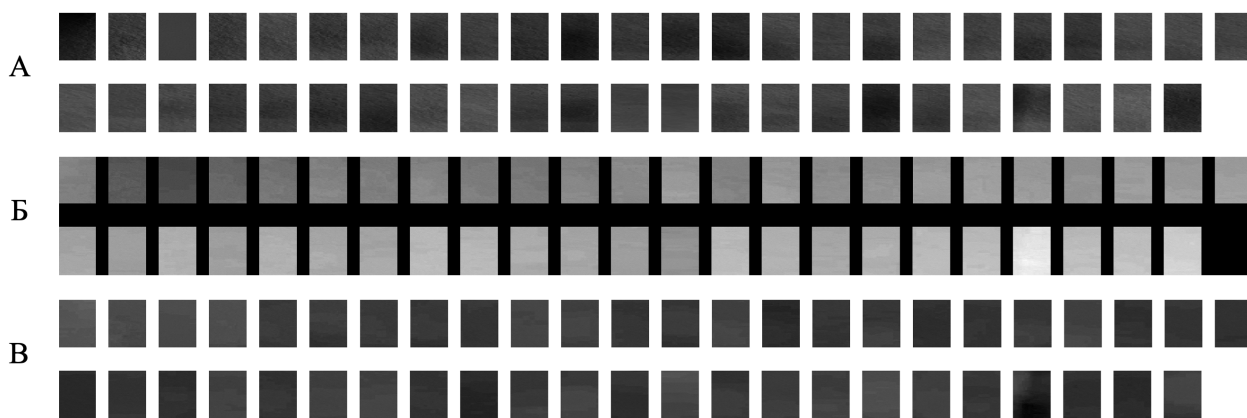


Рис. 2.7. Преобразованные стандартные RGB фотографии (см. 2.6) стек изображений для отдельных каналов цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$: А – канал L^* ; Б – канал a^* ; В – канал b^* . Здесь кодировка оттенков серого соответствует представлению минимума черным цветом, максимума – белым. На субпанели Б использован черный фон для более контрастной видимости.

от его светлоты.

Поэтому исследуемая последовательность фотографий кюветы, которые были сделаны непосредственно перед измерением оптической плотности, была обработана стандартными функциями системы обработки изображений ImageJ, осуществляющими преобразование в цветовое пространство $L^*a^*b^*$. Рис. 2.7 показывает качественную динамику изменения интенсивности в каждом из каналов при трансформации исходного изображения в трехмерный стек, каждый элемент которого содержит информацию по выделенному цветовому каналу. Здесь она визуализирована в виде 8-битных монохроматических изображений.

Однако, для установления количественного соотношения между колориметрическими и концентрационными зависимостями в ходе реакции следует оперировать непосредственно с числовыми данными в цветовых каналах и использовать статистическую обработку пикселей по всему изображению кюветы. На рис. 2.8 показано соответствующее изменение во времени медианной интенсивности каналов в цветовом пространстве CIE $L^*a^*b^*$, сделанных перед моментом измерения поглощения.

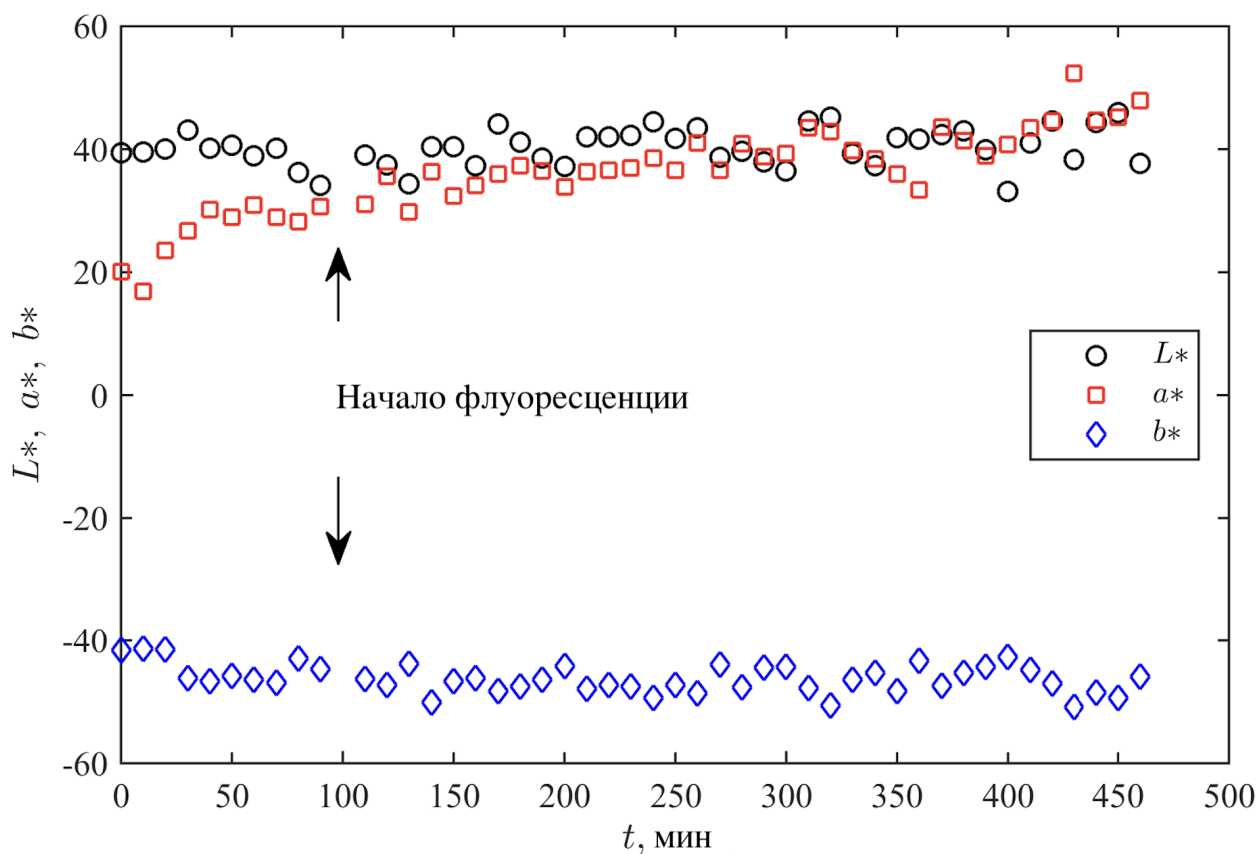


Рис. 2.8. Временная динамика медианных значений величин, соответствующих каналам цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$, для изображений экспериментальной ячейки. Планки ошибок показывают стандартное отклонение.

Видно отсутствие значимого нестационарного тренда как для L^* , так и для b^* и заметный рост переменной a^* . Последнее соответствует росту пурпурности раствора с увеличением количества резорфуфина. Причем качественный ход этой последовательности напоминает кривую для концентрации резорфуфина на рис. 2.4: более быстрый до начала флуоресценции и более плавный после. Таким образом, можно прийти к выводу, что цветовая эволюция раствора, в котором осуществляется восстановление резоруфина до резорфуфина, может быть охарактеризована изменением одной переменной так же, как и изменение концентрации действующих веществ.

Чтобы количественно оценить это сходство, был проведен корреляционный анализ: построены обе зависимости для одних и тех же моментов времени, см. последовательность маркеров на рис. 2.9 А. Видно, что

они следуют линейному тренду. Соответствующий коэффициент корреляции достаточно высок и равен 0.91. Линия тренда задается уравнением $c_{Rz} = 0.014a * -0.234$, при этом 95%-ные доверительные интервалы составляют (0.012, 0.016) для наклона и (-0.31, -0.16) для сдвига соответственно. Учитывая, что уровень колориметрических шумов значительно превышает фотометрическую точность УФ-спектрометра, предел обнаружения определяется в первую очередь. С помощью стандартной функции MATLAB uncertainty quantification preint, рассчитывающей интервал предсказания регрессионной модели, предел обнаружения, соответствующий заданным параметрам линейной регрессии, был определен как 0.1 от относительной концентрации резорфуфина в растворе на уровне стандартной неопределенности. Стоит отметить, что этот результат хуже, чем тот, которого можно достичь методами спектрального анализа, но, в отличие от проблем разработки спектрометрических биосенсоров, ориентированных, по сути, на аналитическую химию в строгом смысле слова [115], такой предел обнаружения приемлем для обычных применений тестов на основе резорфурина. Например, его основное применение (REMA) - бинарная классификация состояния "рост/не рост-на уровне либо 50%, либо 95% лекарственного ответа [116]. Учитывая практическую оценку величины неопределенности, связанной с плотностью референтной микробиологической популяции в таких тестах, полученный предел обнаружения может удовлетворять не только первому, но и второму критерию.

Рис. 2.9 Б иллюстрирует восстановление временной динамики концентрации производимого резорфуфина на основе выявленной линейной зависимости между колориметрическим индикатором и концентрацией, найденной при помощи УФ-спектрофотометрии в зависимости от времени реакции. Здесь необработанные медианные значения a^* для каждого момента времени пересчитываются в концентрацию по методу УФ и накладываются на результаты измерений. Видно, что полученные значения, представлен-

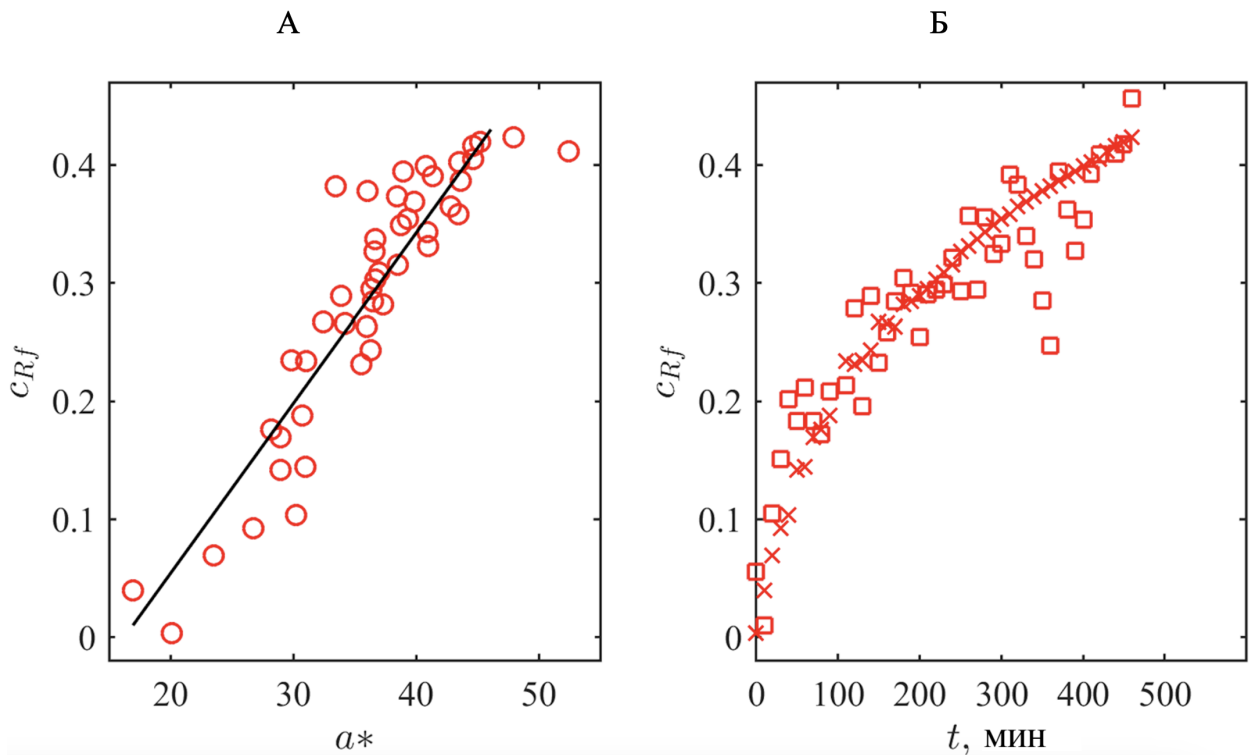


Рис. 2.9. (А) График корреляции между значениями цветового канала a^* и нормированной концентрацией резорурфина, определенной с помощью УФ-спектрометра. (Б) Временная динамика роста концентрации резорурфина (крестики соответствуют таковым на рис. 2.4) и путем отображения значений a^* (квадраты соответствуют таковым на рис. 2.8) в пространство концентраций (линейное отображение соответствует функции, изображенной на рисунке (А) в виде прямой линии).

ные квадратами, равномерно разбросаны вокруг эталонных данных, представленных крестиками (они представляют собой решение для концентрации резорурфина, экспоненциально стремящейся к насыщению, как следует из уравнения (2.6)), особенно в области после начала флуоресценции, т.е. в условном диапазоне теста REMA. До начала флуоресценции наблюдается некоторое (хотя и не резкое) завышение. Это согласуется с рассмотренной выше особенностью, согласно которой спектры на основе УФ занижают концентрацию из-за специфичности спектрального отклика. Напротив, колориметрия определяет "степень покраснения непосредственно обусловленную присутствием резорурфина. Таким образом, в области отсутствия флуоресцентного сигнала, т.е. в условиях, при которых стандартный спектрофлуориметр, применяемый в данном типе биомедицинских исследований,



Рис. 2.10. Схема калибровки данных, направленная на выявление корреляции между данными UV-Vis, колориметрии и фотометрии, и соответствующих микробиологических измерений на ее основе.

покажет отсутствие производства резорурфина (что не соответствует действительности), колориметрия может оказаться более надежным методом для количественной оценки процесса.

2.5. Выводы по главе

- Путем спектрофотометрических исследований модельной химической системы, воспроизводящей восстановление резазурина до резорурфина в растворе с изменением цвета последнего в соответствии с границами, наблюдаемыми при резазуриновом тесте в условиях стандартных биофизических и биомедицинских исследований установлено, что данная реакция адекватно описывается кинетикой первого порядка, что дает аналитическое выражение для временной динамики индикатора-резорурфина, что будет использовано далее при анализе данных биофизических экспериментов с микробными средами.
- Показано, что использование цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$ ре-

дуцирует набор изменяющихся колориметрических показателей до одной переменной – значений в канале a^* , причем наблюдается линейная корреляция их величины с величиной концентрации резорурфина.

- Установленный факт открывает также возможности для дальнейшего использования более простых фотометрических методов, в том случае, если отклик соответствующих датчиков оптической плотности среды будет оптимизирован к максимальной чувствительности к изменению показателей в канале a^* цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$.
- Разработанная схема калибровки данных дает возможность сформулировать принципиальную схему последовательности проведения исследований уже с биологическими средами, представленную на рис. 2.10, реализация которой будет рассмотрена в последующих главах.

Материал, изложенный в главе, соответствует публикации [117].

Колориметрический и фотометрический анализ воздействия минимальной ингибирующей концентрации лекарственных препаратов на микобактерии

3.1. Введение

Как отмечено в первой главе, колориметрический резазуриновый тест исходно рассматривался как качественный метод детектирования бактериальной контаминации среды. Введение колориметрического резазуринового теста для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) лекарственных средств, действующих на культуру *M. tuberculosis*, при исследовании с использованием 96-луночного микробиологического планшета с логарифмическим серийным разведением действующего вещества (тест REMA), впервые был описан в работе [70], в настоящее время стандартизирован [71] для медицинского применения с формулировкой “Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) каждого препарата трактуется как самая низкая концентрация антибиотика, которая предотвращает изменение цвета резазуринового красителя”.

В целом, колориметрическое разрешение концентрационного предела обнаружения резорурфина хуже, чем у спектральных методов анализа, используемых в аналитической химии. Однако, как продемонстрировано в предыдущей главе, наличие явной линейной зависимости между искомой концентрацией и параметром a^* цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$ делает возможным превзойти порог бинарной классификации (рост/не рост) на логарифмическое серийное разведение действующего вещества, оперируя с

количественно определенной кривой “доза-отклик”, а также количественно оценить неопределенность целевых параметров.

Учитывая это, простота REMA-теста может расширить диапазон методик его применения путем использования как различных колориметров, так и фотофиксацию экспериментальных растворов с помощью, например, камеры обычного смартфона. Данный подход позволит проводить испытания не только в специализированных лабораториях, но и в любых доступных условиях. Поэтому в этой главе будут рассмотрены возможности колориметрического (и основанного на его базе фотометрического) подхода в сравнении с спектрофотометрической квантификацией при проведении теста REMA и их приложение к практической задаче характеристики ряда новых антимикобактериальных препаратов в процессе их лабораторного тестирования.

3.2. Колориметрический подход к определению МИК

3.2.1. Фотографический метод

Так как в ходе резазуринового теста REMA раствор, содержащий культуру микроорганизмов, питательную среду, индикатор и (при наличии) действующее вещество, подавляющее рост микроорганизмов, можно рассматривать как совокупность простых цветных объектов, соответствующих лункам микробиологического планшета, то можно применить к каждой из них колориметрический подход, аналогичный рассмотренному выше при экспериментах с изменением цвета индикаторного раствора при восстановлении резазурина до резорюфина под действием гидразина.

Предлагаемый метод основан на определении МИК, используя фотографию микробиологического планшета с дальнейшей постобработкой изображений и преобразованием этих данных в численные значения цветовых каналов, подлежащих дальнейшему анализу. Рассмотрим последова-

тельность действий, используя изображение микробиологического планшета, приведенное в работе [118] как результат тестирования вещества, рассматриваемого как кандидат в антимикобактериальные лекарственные средства – 1-4-[2-(хинолин-4-ил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]пиримидин-2-илпиперидин-4-ил)метанола – действующего на стандартный лабораторный штамм H37Rv микобактерии *M. tuberculosis*. Данный выбор для верификации колориметрического метода обусловлен тем, что в работе [118] представлены количественные результаты измерения флуоресценции рифампицина во всех ячейках планшета, измеренные при помощи планшетного флуориметра FLUOstar Optima (BMG Labtech, Оффенбург, Германия), которые могут быть использованы в качестве референтных.

Обработка фотографий микробиологических планшетов

На первом этапе полученное фотографическое изображение (рис. 3.1А) обрабатывалось с помощью программы ImageJ, аналогично тому, как были обработаны фотографии кювет с тестовой реакционной смесью резазурина и гидразина. Но в случае с планшетом была проведена коррекция освещенности общего фона с помощью процедуры "Process/Subtract Background" (рис. 3.1, основанной на алгоритме "rolling ball" [119]). Этот процесс позволяет выровнять уровень освещения на всей площади планшета, получив изображение, представленное на рис. 3.1 Б.

Следующая операция подразумевает сборку цветовой информации по каждой из 96 лунок планшета. Для работы с микробиологическими планшетами ImageJ имеет специальный плагин "ReadPlate 3.0" [120]. Плагин работает только с RGB изображениями (что совпадает с исходной цветовой схемой фотографии), поэтому далее будет рассмотрен последовательный цветовой анализ. Данные о цвете записывались путем усреднения по круговой области, которая должна быть расположена четко внутри границы каждой лунки. В результате последовательного извлечения интенсивности,

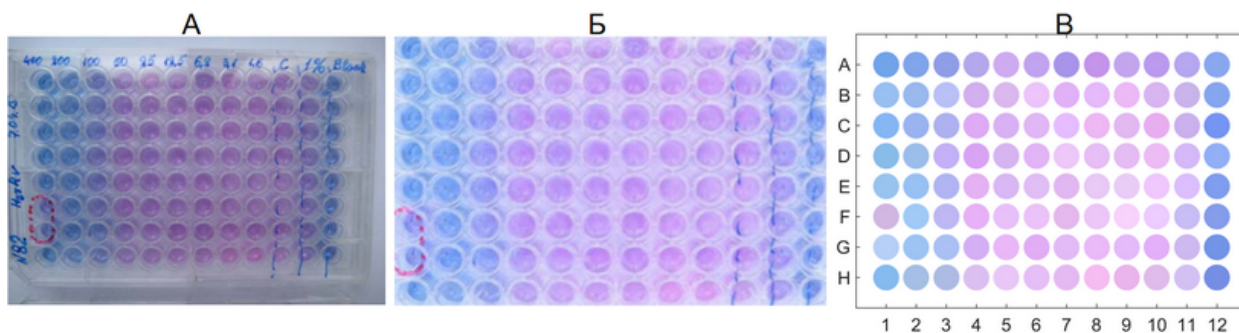


Рис. 3.1. Пример постобработки фотографии планшета: (А) исходное фото планшета, (Б) центральная того же фото после вычитания фона и выравнивания освещенности, (В) усредненное распределение цветов по лункам планшета, сформированное на основе обработки фотографии.

отдельно для каждого из цветов (красного, зеленого, синего), складывались из значений в выбранных круговых зонах, центрированных в лунках для каждого отдельного ряда планшета.

Полученные выходные данные имеют вид текстовой таблицы в формате *.csv*, которая содержит информацию о средней интенсивности цветового канала внутри выбранной зоны в лунке, а также в окружающих лунку маленьких кружках, что позволяет провести дополнительную локальную калибровку неравномерности освещения, используя ближайшие окрестности каждой из лунок. Соответствующая процедура использует данные о необходимой коррекции, в выходной таблице плагина как

$$A_{corr} = -\log_{10} \left(\frac{I}{255} \right) + \log_{10} \left(\frac{I_{surr}}{255} \right) = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_{surr}} \right),$$

то есть значение в колонке *Auncorr* задает скорректированное изменение интенсивности сигнала, как отношение интенсивности цвета в лунке I , к интенсивности ее окружения I_{surr} (т.е. нецветного пластика) с учетом 8-битной дискретизации (255 соответствует белому цвету)

$$I_{corr} = 10^{-A_{corr}} = \frac{I}{I_{surr}}.$$

Так как заполненная раствором лунка на просвет будет темнее, чем пустой чистый планшет, то значение I_{corr} по всем цветовым каналам должно

быть $0 \leq I_{corr} \leq 1$. В идеальном случае полностью прозрачный планшет на белом фоне должен давать триплет белого цвета $[1, 1, 1]$ (или $[255, 255, 255]$ в 8-битном представлении). В реальности на фото он будет слегка серым и будет задан триплетом $[\alpha_R, \alpha_G, \alpha_B]$, где $\alpha_X < 1$ ($X = R, G, B$) и зависит от окрестности конкретной лунки. При этом сама по себе лунка также будет тусклой, поэтому дробь должна остаться меньше единицы. С другой стороны, в реальности может быть исключение в том случае, когда очень яркий цветовой канал может быть интенсивнее, чем средне-серый окружающий фон. Это может проявляться за счет того, что при работе с фотографией проводится обработка отраженного изображения, а не изображения просвеченного планшета, как это было показано в оригинальной работе [120]. При этом яркий синий цвет резазурина в лунке может соответствовать триплету $[0, 0, 1]$ (также на это будут влиять нанесенная синяя маркировка) при уровне серого цвета окружающего планшета $\alpha < 1$, что приведет к $I_{corr} > 1$. К аналогичному эффекту могут приводить блики на фото с поверхности и краев лунок.

Поэтому необходимо провести еще один этап коррекции: найти максимальное значение I_{corr} . Для этого по всем лункам и всем цветовым каналам проверяется наличие в общем массиве значений больше единицы. В случае, если отклонений не выявлено, то никаких дополнительных действий применять не нужно. Если отклонения присутствуют – необходимо поделить значения скорректированной интенсивности по всем лункам для всех каналов на это максимальное значение. Т.е. все интенсивности по всем каналам делятся на одно и то же число, это приведет к равномерному общему потемнению (с результатом, не выходящим за пределы от черного $[0, 0, 0]$ до белого $[1, 1, 1]$).

Для иллюстрации, какие именно цвета лунок определены таким способом, на их основе сгенерировано изображение планшета, представленное на рис. 3.1 В.

Следующим шагом является выполненный при помощи программы на языке MATLAB перевод данных о цветовой информации в цветовое пространство CIE $L^*a^*b^*$ с последующей статистической обработкой и исследованием соответствия динамики в цветовых каналах переходу между резазурином и резоруфином.

Распределение интенсивности цветовых каналов (a^* и b^* , так как канал L^* показывает общий уровень освещенности; в данном случае он зафиксирован с единичным значением) показано на рис. 3.2. Видно, что при разбросе точек в вертикальном направлении (относительно при этом стабильном), происходит их явный сдвиг по оси абсцисс, т.е. в сторону роста координаты a^* . Особенно ясно это видно по последовательности медиан по колонке, обозначенных квадратиками, где четыре маркера следуют достаточно горизонтальной прямой, а дальнейшие сосредоточены в не особенно сильно отклоняющейся от нее локализованной области, соответствующей малиновому цвету. Единственная выбивающаяся вниз точка – медиана крайней колонки (№. 12 планшета, см. рис. 3.1). Она содержит чистый резазурин без культуры, и добавок, как крайняя, затемнена на исходной фотографии, что полностью не исправлено даже применением коррекции освещенности.

Более детально данную зависимость можно проследить на графиках, показанных на рис. 3.3, где приведены значения как индивидуально в лунках планшета в ряду (пустые точки), так и медианное значение по ряду (крестики) и среднее медианное отклонение (усы, однако, практически совпадающие с размером маркеров-крестиков), домноженное на 1.5, что дает величину, близкую к соотношению среднего медианного и среднеквадратичного отклонений для нормально-распределенных случайных величин; такая процедура соответствует рекомендациям для работы с малыми выборками, характерными для биомедицинских данных [121].

Можно заметить, что с уменьшением концентрации действующего ве-

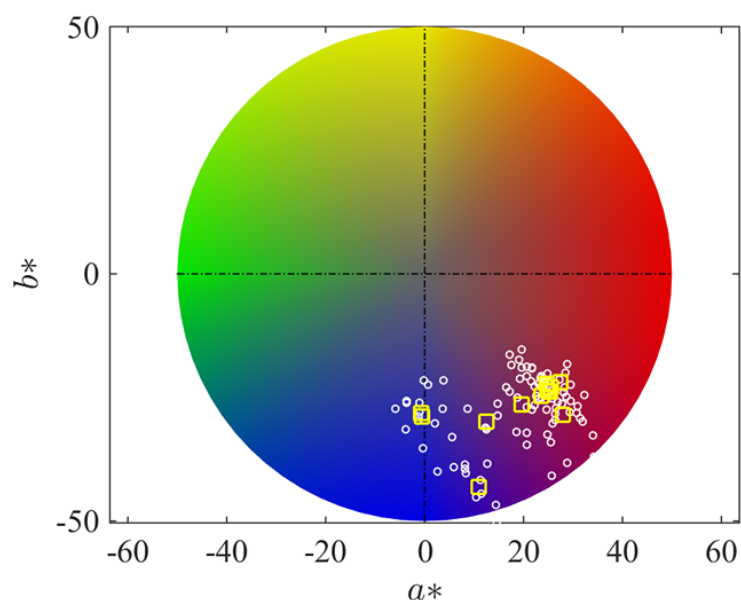


Рис. 3.2. Положения точек, соответствующих средним скорректированным цветам в всех ячейках планшета на цветовом круге системы CIE L*a*b* (кружки) и медианные значения по колонкам (квадратики).

щества (рост номера колонки от 1 до 4) значение интенсивности в канале a^* действительно заметно растёт, после чего выходит на практически горизонтальную прямую, что имеет непосредственную интерпретацию как прекращение подавления бактериального роста антибиотиком, когда его концентрация падает ниже минимальной ингибирующей концентрации (МИК). В контрольных колонках 11 (1 %) и 12 (Blank) значение интенсивности канала a^* падает. Одновременно с этим, величина интенсивности канала b^* не проявляет выраженного тренда к наклону, как и было отмечено в тестовом эксперименте с гидразином. Исключение – точка, соответствующая колонке No. 12, которая уже обсуждалась как, по всей видимости, обусловленная качеством исходной фотографии.

Таким образом, данный анализ подтверждает вывод о ключевой роли значений канала a^* цветового пространства CIE L*a*b* для характеристики перехода резазурина в резорурфин, достаточно четко проявляющейся не только в тестовом химическом эксперименте, но и в условиях, когда данная реакция катализируется биохимическими процессами в ходе жизне-

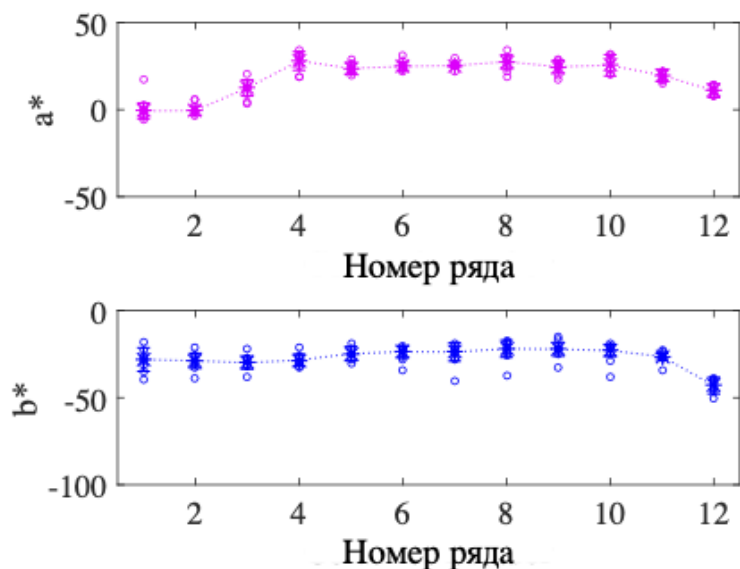


Рис. 3.3. Зависимости значений цветowych каналов схемы CIE L*a*b* от номеров рядов микробиологического планшета: кружки показывают значения в индивидуальных лунках, звездочки – их медианные значения (соединены пунктирной линией для визуальной ориентации), “усы” показывают границы соответствуют отклонениям $1.5MAD$.

деятельности живых организмов (бактерий) в условиях, соответствующих протоколу микробиологического исследования REMA.

Сопоставление колориметрических и флуориметрических кривых "доза-отклик"

В работе [122] было обосновано, что распределение уровня флуоресценции в ячейках микробиологического планшета, обусловленное накоплением резорурфина за счет жизнедеятельности микобактерий, не подавленной действием антибиотика, в ходе теста REMA, удовлетворяет кривой “доза–отклик” в форме функции Хилла, типичной для задач регрессии фармакокинетических данных [123]

$$NDR(c) = b_1 + \frac{b_2 - b_1}{1 + (c/b_3)^{b_4}} \quad (3.1)$$

с четырьмя параметрами: верхняя и нижняя асимптоты кривой отклика построенной регрессией непосредственно экспериментальных данных зада-

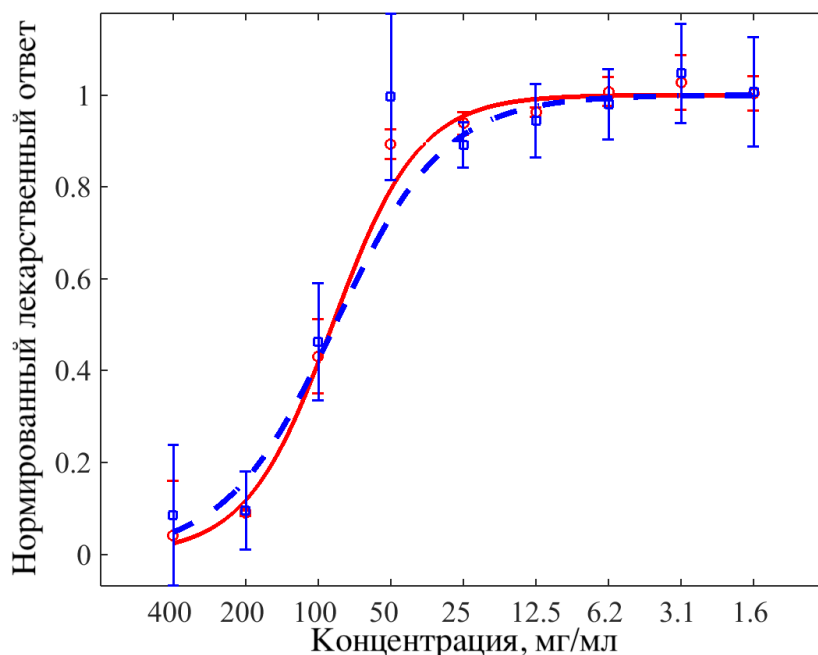


Рис. 3.4. Пример зависимости “доза-отклик” при воздействии 1-4-[2-(хинолин-4-ил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]пирими-ди-н-2-ил-пиперидин-4-ил)метанола на штамм *M. tuberculosis* H37Rv: красные и синие маркеры представляют данные по флуоресценции и колориметрии, соответственно; усы маркеров соответствуют среднему медианному отклонению. Кривые соответствующих цветов – регрессия данных функцией Хилла.

ются b_1 и b_2 соответственно (в силу реальных особенностей протекания эксперимента и полученных данных они могут отличаться от 0 и 1), $b_3 = IC_{50}$ – концентрация, при которой кривая ингибирования принимает половинное значение между асимптотами; b_4 – феноменологический степенной показатель функции Хилла. Красная кривая на рис. 3.4 показывает соответствующую нормированную кривую регрессии спектрометрических данных, представленных в работе [118], построенную при помощи программы, разработанной в работе [122].

В ходе данного колориметрического исследования, выполнено следующее: значения флуорометрических единиц в таблице, являющейся выходным форматом спектрофотометра FLUOstar Optima, заменены на значения цветового канала a^* , определенные выше и применена аналогичная программа обработки. В ходе ее выполнения первым шагом являлась нор-

мировка значений в цветовом канале a^* следующим образом: за 0 принимается величина, соответствующая раствору сравнения, не содержащему микобактерии (Blank) – медиана в колонке 12, за 1 – величина, соответствующая раствору, в котором отсутствует лекарство (С) – медиана в колонке 10; значения в колонках перенормируются как

$$\tilde{a}_* = \frac{a^* - M(a_{12}^*)}{M(a_{10}^*) - M(a_{12}^*)},$$

после чего вычислялись медианы и средние медианные отклонения для перенормированных величин \tilde{a}_* .

Далее проводится нелинейная регрессия значений нормированных медиан титра концентраций функцией отклика Хилла (3.1). С целью более наглядного сравнения регрессии флуорометрических и колориметрических данных (так как интервал единиц флуоресценции и цвета отличается), финальное представление данных перенормировано таким образом, что асимптотически минимальное и максимальное значения кривой Хилла перенормированы таким образом, чтобы они равнялись 0 и 1, соответственно.

Видно, что обработанные таким образом колориметрические данные количественно воспроизводят результат, полученный для тех же препаратов и образцов с помощью спектрофотометра, измеряющего флуоресценцию резорфина. Все отклонения находятся в пределах экспериментальной погрешности для всей кривой “доза-ответ”. Таким образом, колориметрический метод является адекватным для количественного нахождения минимальной ингибирующей концентрации действующего вещества; практическое приложение данного подхода рассматривается далее.

3.2.2. Практическое применение колориметрического метода в ходе исследования новых антимикобактериальных препаратов нитрофуранового ряда

Метод был применен в ходе совместной работы с коллегами из Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ, которые синтезировали четыре новых соединения, рассматриваемых как перспективные кандидаты в лекарственные средства, подавляющие активность антибиотикоустойчивых микобактерий *M. tuberculosis*: 8-(4-Метил-4Н-1,2,4-триазол-3-ил)-6-(метилсульфонил)-2-(5-нитро-2-фурил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан (далее использована аббревиатура LK 01689); 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-циклогексил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фууро[3,4-d]пиримидин (аббревиатура LK 01676); 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-пропил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фууро[3,4-d]пиримидин] (аббревиатура LK 01672); 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-фенил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фууро[3,4-d]пиримидин] (аббревиатура LK 01672).

Эксперименты с живыми культурами *M. tuberculosis*, включавшими стандартный лабораторный штамм H37Rv и четыре клинических штамма из библиотеки штаммов СПб НИИФ, зарегистрированных под номерами 396у, 4542, 6691 и 7074, для которых установлена резистентность к антимикобактериальным препаратам первой линии, были выполнены в специальной бактериологической лаборатории СПб НИИФ согласно стандартному протоколу REMA и полученные фотографии микробиологических планшетов (см. рис. 3.5–3.9) переданы для дальнейшей обработки и анализа.

Эти фотоизображения были обработаны согласно процедуре, описанной выше и для каждого из них определены кривые “доза–эффект”, соответствующие функции Хилла (3.1); линия фита и его параметры также приведены на рис. 3.5–3.9 для каждого из случаев. Следует отметить, что ряд точек, соответствующих медианам по колонке, были исключены из рас-

Таблица 3.1. Минимальные ингибирующие концентрации (в единицах мкг/мл) для каждой комбинации препарат-штамм.

Вещество / штамм	396y	4542	6691	7074	H37Rv
LK 1672	0.0258	0.0285	0.0135	0.0775	0.0284
LK 1674	0.0169	0.0265	0.0101	0.0606	0.0404
LK 1676	0.017	0.0279	0.0152	0.083	0.0497
LK 1689	0.0173	0.0297	0.0124	0.0441	0.0241

смотрения как явные выбросы. Это относится к рис. 3.6 Б, рис. 3.7 А и Б, рис. 3.8 А, В и Г, рис. 3.9. Их возникновение, по-видимому, связано с неравномерностью освещения и углом наклона при фотографировании, за счет чего систематически возникало занижение данных вблизи левого края планшета.

Следует отметить, что данный подход оперирует с полной непрерывной кривой “доза-эффект”, соответственно, дает возможность определять стандартные показатели отклика IC50 и IC95 (50% и 95 % ингибирующие рост концентрации). Однако в контексте микобактериальных исследований, учитывая при этом характерную величину разброса цветового отклика по ячейкам колонки планшета, а также стандартное визуальное определение МИК, в данном случае за минимальную ингибирующую концентрацию принято значение IC 75, соответствующее положению первого квартиля отклика (показано звездочкой на кривых на рис. 3.5–3.9). Оно соответствует середине интервала цветового перехода от синего к розовому, когда количественная характеристика цвета позволяет говорить о его изменении (в соответствии с медицинским стандартом для МИК [71]), при этом средние медианные отклонения находятся в пределах отклика, относящегося к данному цвету (то есть больше или меньше IC50 при бинарной классификации, соответственно). Численные значения, определенных таким образом МИК, для каждого соединения и штамма представлены в таблице 3.1.

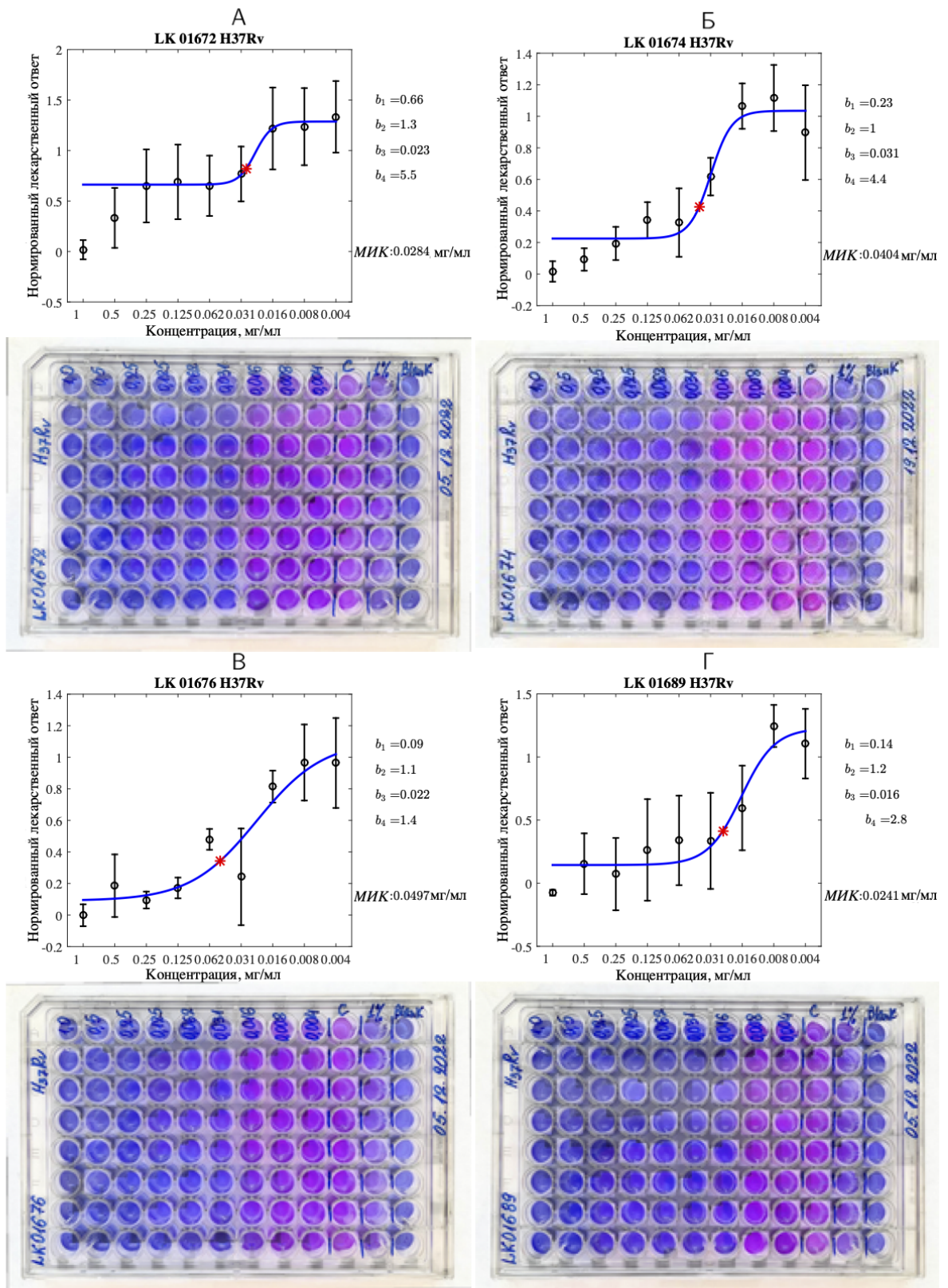


Рис. 3.5. Определение минимальной ингибирующей концентрации четырех новых лекарственных соединений при действии на стандартный штамм *M. tuberculosis* H37Rv (колориметрическая кривая и исходные фото, предоставленные СПб НИИФ).

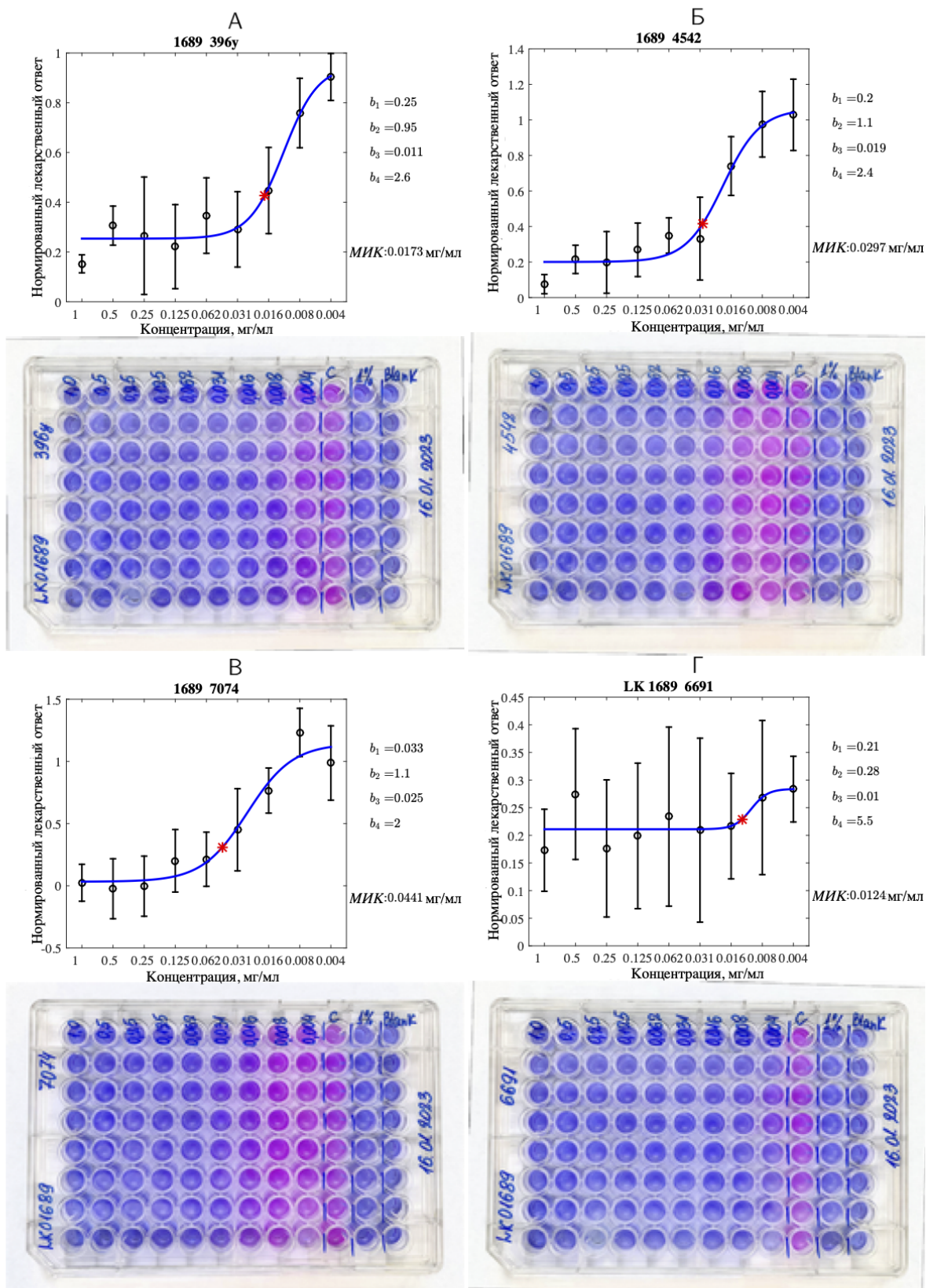


Рис. 3.6. Определение минимальной ингибирующей концентрации лекарственного соединения LK 1689 при действии на клинические штаммы *M. tuberculosis* (колориметрическая кривая и исходные фото, предоставленные СПб НИИФ).

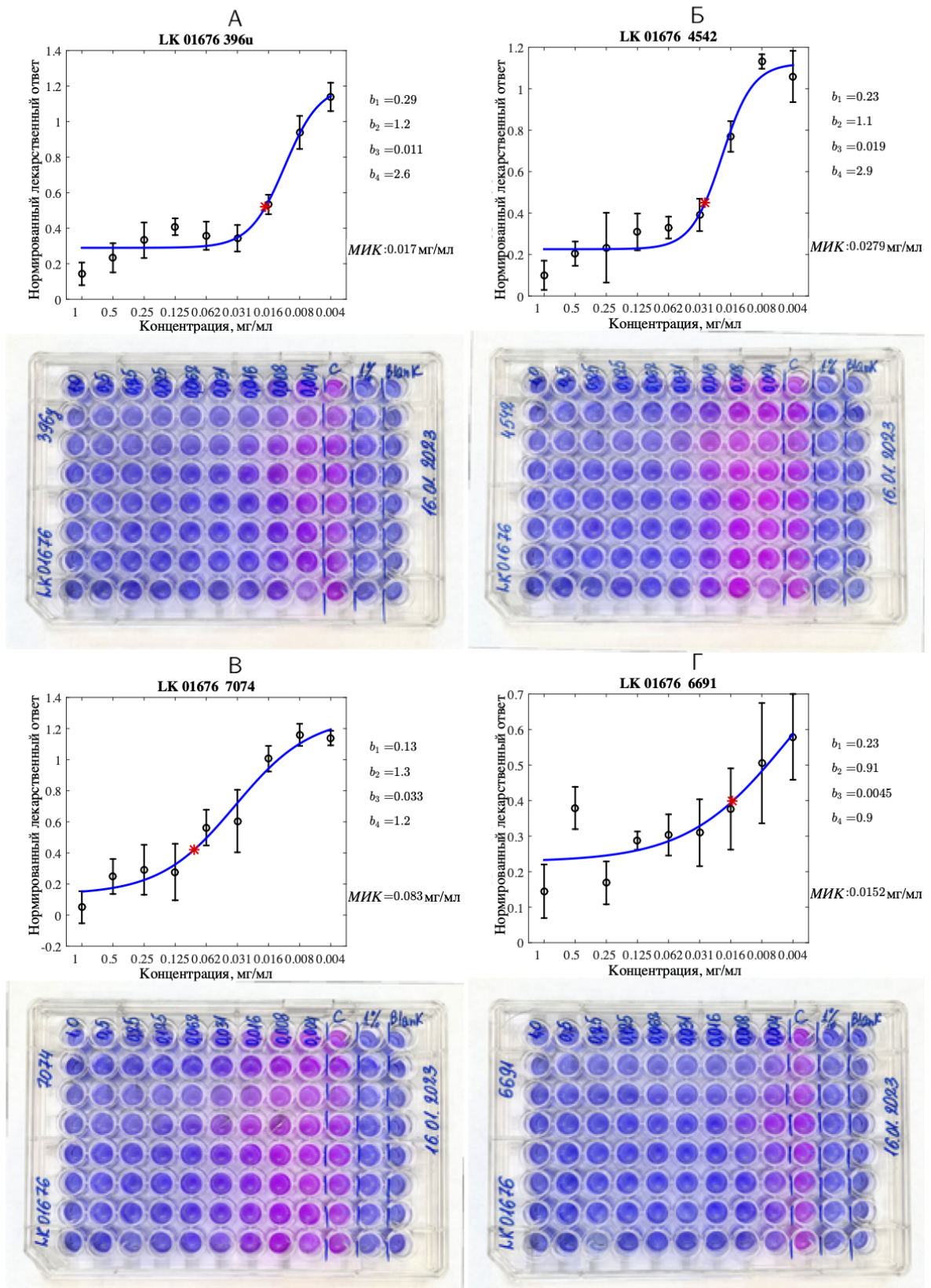


Рис. 3.7. Определение минимальной ингибирующей концентрации лекарственного соединения LK 01676 при действии на клинические штаммы *M. tuberculosis* (колориметрическая кривая и исходные фото, предоставленные СПб НИИФ).

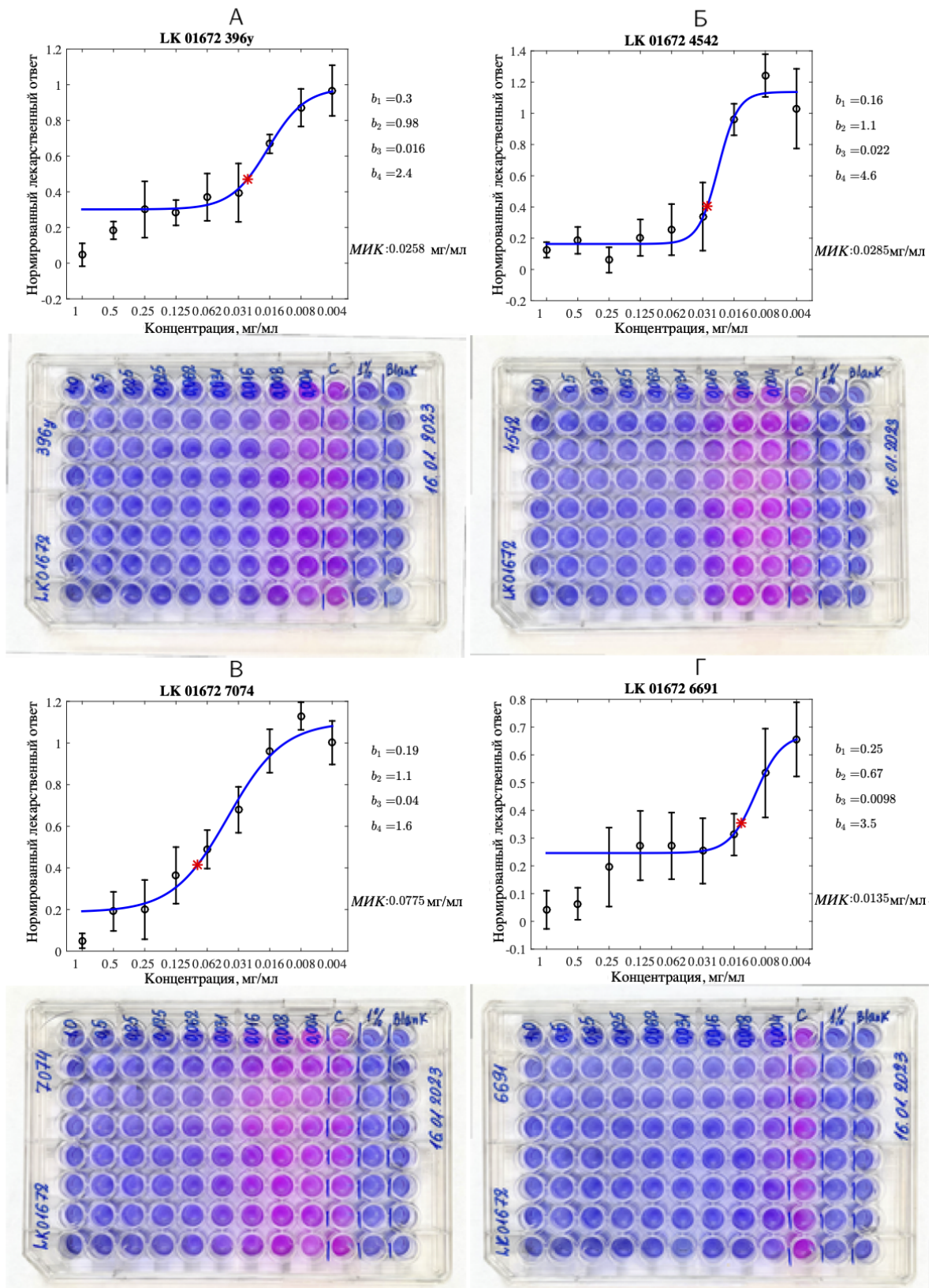


Рис. 3.8. Определение минимальной ингибирующей концентрации лекарственного соединения LK 01672 при действии на клинические штаммы *M. tuberculosis* (колориметрическая кривая и исходные фото, предоставленные СПб НИИФ).

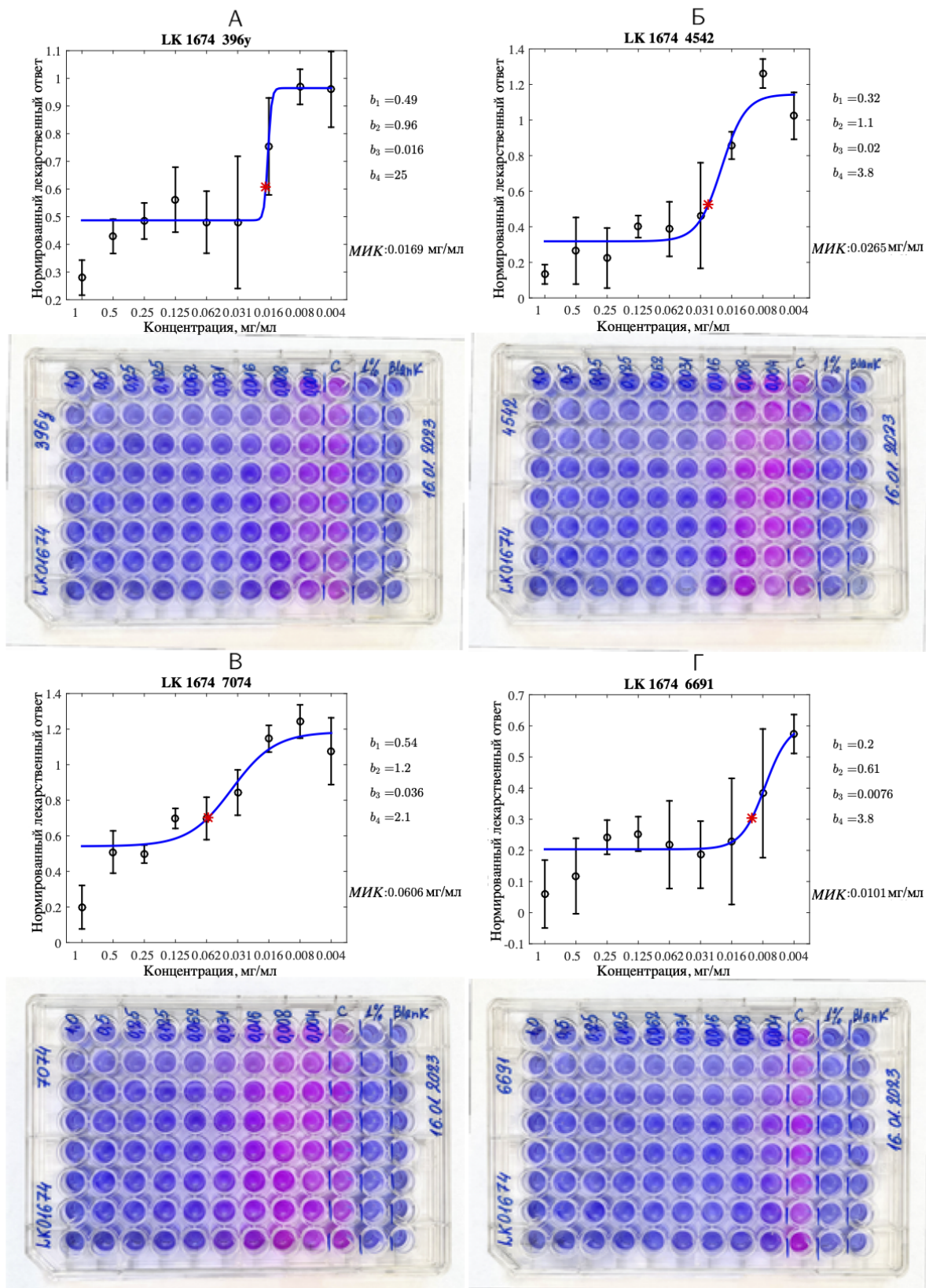


Рис. 3.9. Определение минимальной ингибирующей концентрации лекарственного соединения LK 01674 при действии на клинические штаммы (колориметрическая кривая и исходные фото, предоставленные СПб НИИФ).

3.3. Применение портативного микробиологического анализатора для определения МИК

3.3.1. Калибровка светофильтра ПМА

В ходе решения задачи о разработке недорогой портативной альтернативы коммерческим спектрофотометрам, на основе концепции, изложенной в патенте RU 2 779 840 С1, был собран практически действующий портативный микробиологический анализатор (ПМА), предназначенный для регистрации светопропускания в ячейках стандартного 96-луночного микробиологического планшета.

В рамках цели данного диссертационного исследования возникла задача правильного подхода к определению колориметрических характеристик исследуемых растворов, связанных с цветовым переходом резазурина, во время протекания ферментативных реакций в ходе бактериальной жизнедеятельности с использованием новой установки.

При первичном тестовом запуске в приборе был установлен стандартный рассеивающий светофильтр, который позволял измерять интенсивность светопропускания исследуемого раствора, но в такой комплектации установка не учитывала цветовые спецификации протекающей реакции. В связи с этим возникла необходимость подбора подходящего светофильтра для настройки процедуры фильтрации на фиксацию цветового сдвига раствора в сторону продукта реакции – резорфина. Калибровочные изменения проводились на смеси резазурина и гидразина, аналогично эксперименту, представленному во второй главе диссертации.

Имея в распоряжении данные о всех цветовых переходах исследуемой системы, а также распределение оттенков на цветовой диаграмме CIE $L^*a^*b^*$ (см. рис. 3.2), можно сделать вывод, что необходимый для фильтрации цвет будет лежать на противоположной стороне диаграммы, отно-

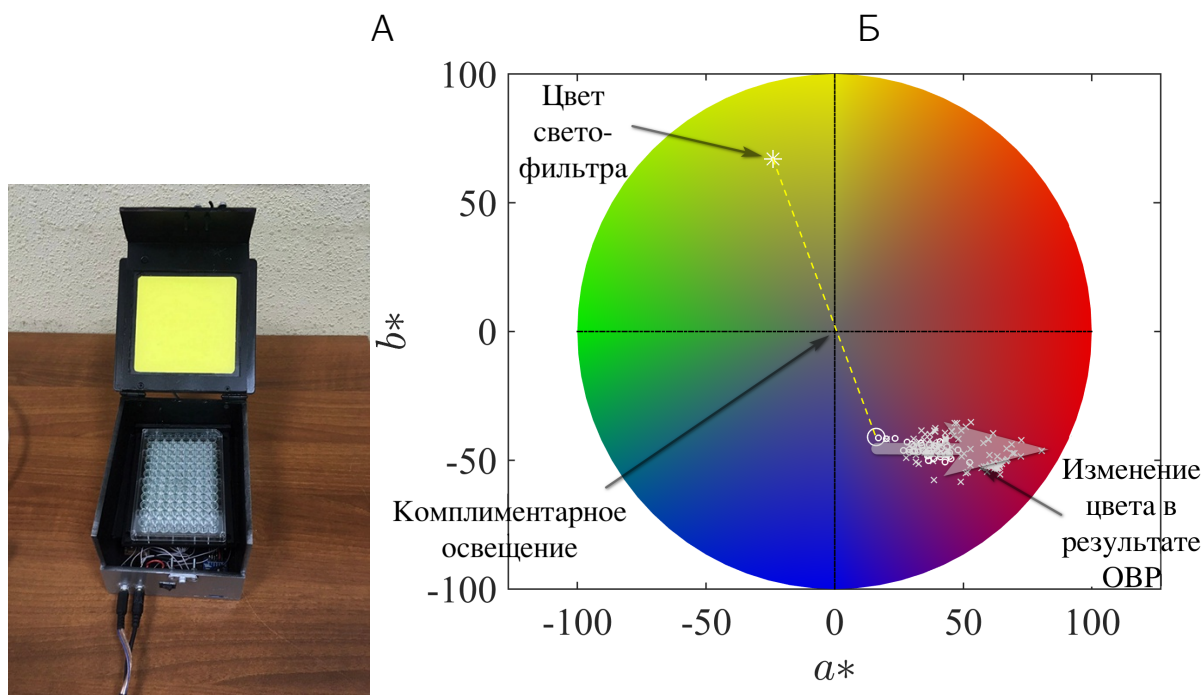


Рис. 3.10. Портативный микробиологический анализатор с видимым светофильтром (А) и цветовой круг схемы CIE $L^*a^*b^*$ с обозначенным положением фильтра, установленного в ПМА, и цветами раствора резазурин-резорурфин-гидразин в различные моменты времени, такие же, как на рис. 2.9 (положения обозначены маленькими кружками), а также цвета из лунок микробиологического планшета (положения обозначены маленькими крестиками), нормированными на ту же интенсивность исходного чистого раствора резазурина (Б).

сительно исходного цвета резазурина и нейтральной точки, отвечающей оттенкам серого, то есть чистой фотометрической индикации, осуществляемой люксметрами прибора. Таким образом, оптимальным цветом светофильтра, является оттенок, соответствующий триплету CIE $L^*a^*b^*$ (96, -24, 67). В результате линия, соединяющая цветовые координаты рабочего раствора резазурина проходит через ноль цветовой плоскости (a^* , b^*) (см. рис. 3.10), что соответствует комплементарному освещению. По положениям сдвига маркеров на 3.10 видно, что фильтрация настроена на обнаружение отклонений, возникающих при линейном сдвиге от этого исходного состояния, т.е. на фиксацию окраски резорурфина.

3.3.2. Определение МИК с использованием ПМА

Так как стандартная процедура определения МИК подразумевает под собой определение изменений индикаторного раствора, определяемого по цвету или флуоресценции синтезируемого за счет жизнедеятельности микроорганизмов резорфуфина, то в ПМА был помещен планшет с подготовленной согласно стандартному протоколу культурой *M. tuberculosis*, штамм H37Rv, и добавлением серийных разведений стандартного антимикобактериального лекарственного вещества – изониазида. Регистрация оптического сигнала, проходящего через лунки планшета, осуществлялась автоматически с временным интервалом в 15 минут в течение 24 часов. Освещение микробиологического планшета для записи оптического сигнала импульсным, а не непрерывным, образом позволяет избежать как избыточного нагревания жидкой среды, так и дополнительного к лекарственному подавлению роста микобактерий. В работе [30] обосновано, что соответствующий эффект становится существенным при непрерывном освещении на длине волны 575 нм, близкой к характерной центральной длине волны осветителя ПМА на протяжении десятков минут, в то время как в данном эксперименте продолжительность освещения, необходимого для записи сигнала, не превышает минуты.

Рис. 3.11 представляет соответствующие значения регистрируемой интенсивности светопропускания, усредненные по ячейкам каждого ряда датчиков с одним лекарственным разведением, с нормировкой на начальное значение.

Можно отметить, что после определенной лаг-фазы, наблюдается практически линейный рост сигнала. При этом явно выражено разбиение линий роста на два типа: для одного из которых (малые концентрации антибиотика) линии группируются в плотную совокупность, с относительно единообразным наклоном (его вариации находятся в пределах ожидаемой

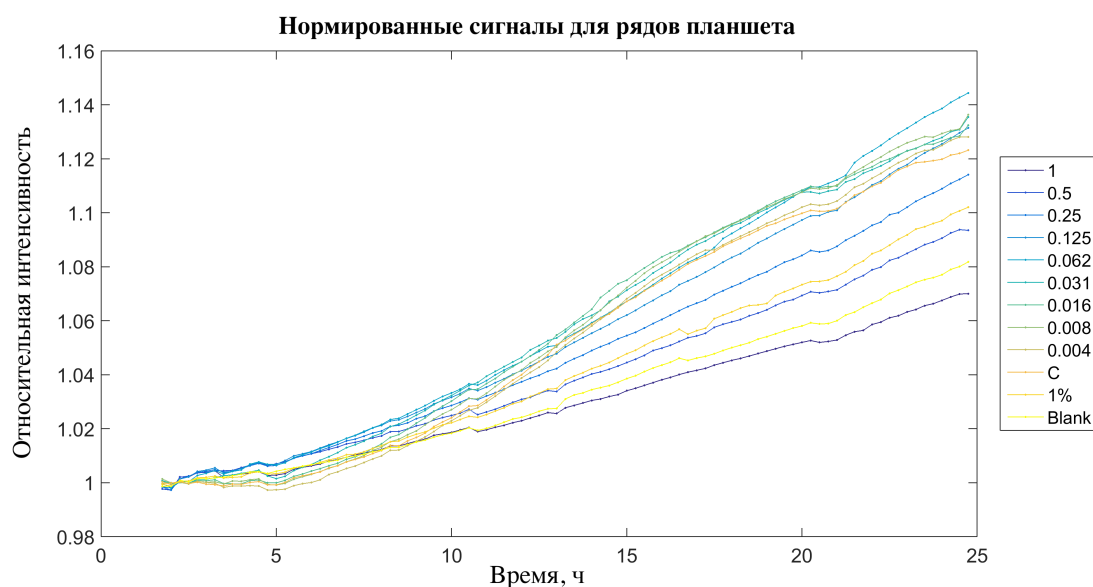


Рис. 3.11. Временная динамика изменения сигнала, регистрируемого ПМА, усредненно-го по лункам планшета, содержащих одинаковую концентрацию действующего лекарственного вещества.

погрешности), соответствующим контролю (без лекарства), а второй характеризуется близкой к линейной зависимостью концентрации антибиотика и величины роста (мало антибиотика – сильный рост, много антибиотика – слабый рост). Регистрируемая линейность роста сигнала согласуется с типичным временем удвоения популяции микобактерий (15–24 часа), то есть рост на протяжении времени эксперимента является мальтузианским, но за одно поколение экспонента при малых значениях приращения аппроксимируется первым (линейным) членом ее разложения в ряд Тейлора (более того, более сложная модель, учитывающая связанные биофизические и химические процессы, которая будет рассмотрена в деталях далее, при малых приращениях приводит к аналогичному выводу).

Стоит отметить, что в случае с контрольным раствором красителя (Blank) также присутствует определенная линейность роста сигнала, что может быть связано с переносом метаболитов или бактерий из соседних рядов при испарении раствора в закрытом планшете или же с фотохимическими процессами в индикаторной среде при частом ее освещении.

Однако, последний процесс происходит во всех лунках планшета и, следовательно, не влияет на зависимость сигнала, измеренного по всем лункам одновременно через сутки, как функцию концентрации антибиотика. Соответствующий график приведен на рис. 3.12 (А).

3.3.3. Сравнение фотометрических и колориметрических данных

На рис. 3.12 (А) черными маркерами-кружками показаны медианные по колонке (8 лунок) значения сигнала, зарегистрированного ПМА через 24 ч после начала эксперимента (в соответствии с протоколом теста REMA для микобактерий) как функция серийного разведения действующего вещества – изониазида. За единицу принята величина медианы сигналов, регистрируемых каждые 15 мин в течение первого часа после добавления резазурина. Было проконтролировано (см. рис. 3.11), что значительных эффектов роста культуры за такой короткий промежуток времени не наблюдается. Медианное значение в силу того, что разброс регистрируемых значений при такой относительно малой выборке может не удовлетворять нормальному распределению, и, следовательно, медиана, как свойство непараметрической статистики, является предпочтительной характеристикой (в отличие от среднего значения). Соответственно, усы обозначают квантили данных 0.05 и 0.95 (расширенный диапазон неопределенности).

На графике видно четкое количественное изменение отклика на уменьшение концентрации препарата: маркеры следуют почти линейно (с небольшим уступом вверх) до концентрации 0.062 мкг/мл. После этого они рассеяны вокруг горизонтальной линии в диапазоне (0.031 – 0.004) мкг/мл и прилегающего к ней исходного контроля (С). Это свидетельствует о практически не нарушенном росте бактерий. Таким образом, можно сделать вывод, что в данной последовательности данных МИК изониазида для стандартного штамма H37Rv составляет от 0.062 мкг/мл до 0.031 мкг/мл. Этот диа-

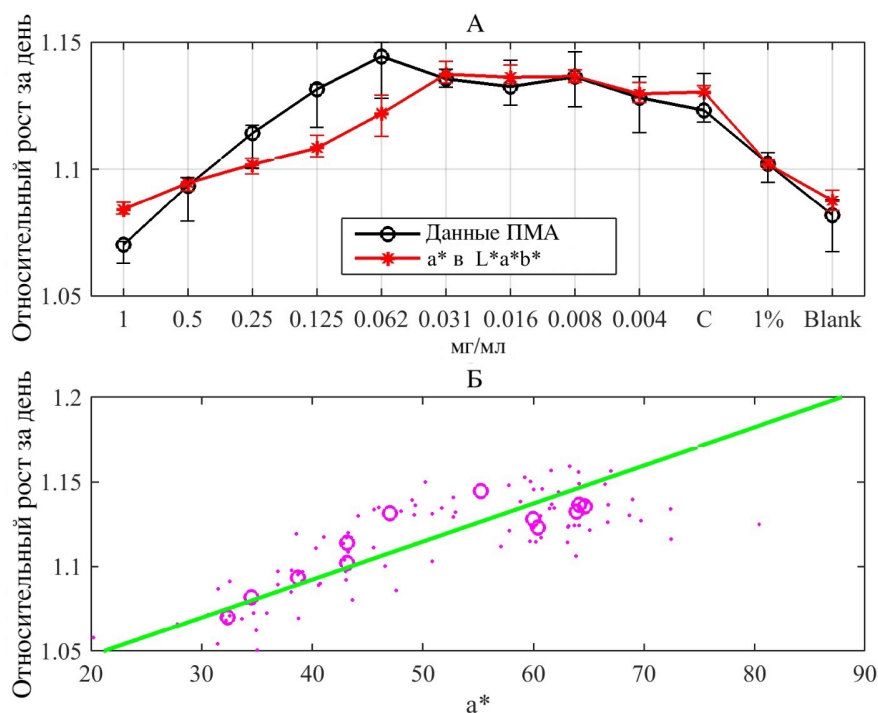


Рис. 3.12. (А) Кривые REMA-теста, полученные количественным колориметрическим (красные звездочки) и фотометрическим (черные кружки) методами; маркеры соединены линиями для визуального ориентира. (Б) График корреляции между колориметрическими данными и фотометрическим относительным ростом (точками обозначены значения для всех 96 отдельных лунок микробиологического планшета; кружками - медианные значения для его рядов).

пазон соответствует стандартным значениям, известным как (0.025 – 0.05) мкг/мл, и среднему значению 0.031 мкг/мл [74]. Сравнение данного значения МИК по ПМА с визуальным определением (в соответствии с методикой, описанной в работах [70, 69]), при котором происходит изменение цвета рядов планшета с голубого на розовый, также подтверждает МИК, равный 0.031 мкг/мл.

Таким образом, можно сделать вывод, что использование ПМА с цветовым фильтром освещения, подобранным в соответствии с колориметрическими характеристиками цветного раствора индикаторной среды, дает адекватное значение минимальной ингибирующей концентрации антимикробного препарата. Этот вывод подтверждается так-

же корреляционным анализом данной (фотометрической) кривой отклика “доза–эффект” и кривой, полученной колориметрическим методом анализа цветной фотографии планшета на основе изменения величины значений канала a^* в цветовом пространстве CIE $L^*a^*b^*$. Соответствующая кривая отклика показана на рис. 3.12 (А) маркерами – красными звездочками. Несмотря на определенное различие наклона в области роста отклика на уменьшение концентрации действующего вещества, локализация перехода к несдерживаемому росту (т.е. МИК) совпадает. Количественно, данное соответствие проиллюстрировано на рис. 3.12 (Б), где отмечается достаточно хорошая линейная корреляция между данными (коэффициент корреляции 95 %).

3.4. Выводы по главе

- Метод количественной колориметрии, основанный на конвертации данных в цветовое пространство CIE $L^*a^*b^*$ и трассирование изменений значений в канала a^* в зависимости от серийного разведения действующего вещества, дает количественное выражение для кривой “доза–эффект” и позволяет тем самым определить минимальную ингибирующую концентрацию на количественной основе.
- Колориметрическая кривая “доза–эффект” соответствует спектрофотометрической кривой флуоресценции резорфина, полученной при помощи спектрофотометра, и представляющая ее функция согласуется с кинетическим механизмом восстановления резазурина до резорфина в клетках микроорганизмов при росте их культуры.
- Тестовые исследования на примере стандартного противотуберкулезного лекарственного препарата первой линии – изониазида – подтверждают, что минимальная ингибирующая концентрация, установлен-

ная для данного вещества известными методами, соответствует значению, найденному при помощи как колориметрического метода, базирующегося на обработке фотографий микробиологического планшета, так и по фотометрическим данным, регистрируемым при помощи портативного микробиологического анализатора.

- Разработанная методика не требует применения дорогостоящего оборудования для получения исходных данных для анализа, который выполняется с использованием свободного программного обеспечения и, таким образом, может быть рекомендовано для широкого применения.

Материал, изложенный в главе, соответствует публикациям [117, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130].

Определение динамики популяционного роста микрокультур с использованием колориметрического метода

4.1. Введение

Как отмечено выше, разазуриновый тест активности микроорганизмов является по сути косвенным, так как изменение цвета (и степени флуоресценции) индикаторной среды напрямую свидетельствует о прошедшей в ней химической реакции, катализируемой жизнедеятельностью живых клеток, но не регистрирует биологический процесс сам по себе. Поэтому при количественном исследовании процессов роста микробных культур в жидкой среде необходимо учитывать протекание сосуществующих физиологических, популяционных и химических процессов.

Существующие в настоящее время практические рекомендуемые подходы являются чисто эмпирическими и основаны на установлении феноменологического соответствия уровня абсорбции или флуоресценции для конкретных видов микроорганизмов, их концентраций и питательной среды [131] без привлечения биофизических моделей популяционного роста и биохимических реакций. Поэтому исследования, приведенные в данной главе, нацелены на более фундаментальный подход, обращающийся к использованию совокупности данных моделей и экспериментальному изучению соответствующей кинетики при различных условиях биофизического эксперимента с последующей интерпретацией наблюдаемых процессов.

4.2. Модель связанной популяционной и химической кинетики

Кинетика реакции восстановления резазурина, которая катализируется реагентом R в общем случае представляет собой двухступенчатый процесс, включающий необратимую и обратимую реакции согласно схеме [58, 59]



где X – резаурин, Y – резорурфин, Z – дигдрорезорурфин, являющийся прозрачным нефлуоресцирующим веществом.

Следует отметить, что в случае больших концентраций активной микробной популяции в жидкой среде, экспериментальная ситуация может демонстрировать весь каскад реакций и цветовых изменений. Качественный пример таких переходов, наблюдаемый для культуры лактобактерий с различным начальным разведением приведен на рис. 4.1 (начальная концентрация микробной культуры в рядах планшета растет снизу вверх). Исходный цвет во всех ячейках планшета на рис. 4.1 (А) соответствует чистому раствору резазурина (см. нижний ряд). Спустя определенное время виден переход цвета в розовый (образование резорурфина) далее в прозрачный (образование дигдрорезорурфина), см. рис. 4.1 (Б). Однако через большой промежуток времени становится существенной обратимость реакции и дигдрорезорурфин снова окисляется до резорурфина и наблюдается стабильное окрашивание ячеек в розовый цвет, см. рис. 4.1 (В). Стоит отметить, что в этом случае обратная реакция окисления дигдрорезорурфина до резорурфина была запущена продуцированием лактобактериями большого количества органических кислот.

В силу этого, достижение обратимого этапа реакции следует по-возможности исключить из экспериментов в ходе теста жизнедеятельности

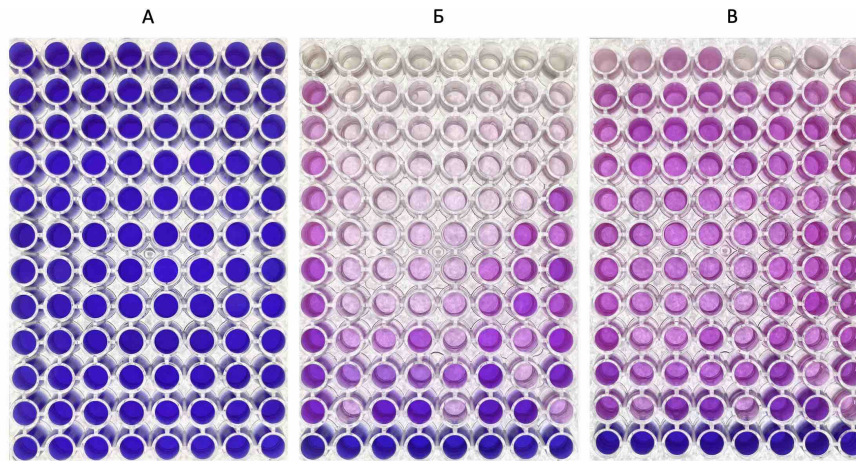
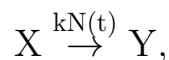


Рис. 4.1. Пример восстановления резазурина до резорурфина и дальнейшего обратимого перехода между резазурином в дигидрорезорурфином в микробиологическом планшете, содержащем культуру лактобактерий с различными начальными разведениями в рядах планшета. Нижний ряд содержит чистый резазурин. (А) Фотография планшета в начальный момент времени; (Б) фотография того же планшета через 72 часа; (В) фотография планшета через 168 часов после старта эксперимента.

микроорганизмов и ограничиться только первым (необратимым) шагом. Такой подход соответствует принятым стандартам биомедицинских исследований, установленным эмпирически. Так как переход резорурфина в дигидрорезорурфин происходит существенно более медленно и каскад реакций (4.1) можно рассматривать как последовательный, то ограниченная химическая модель представляет собой только реакцию первого порядка, катализируемую числом микроорганизмов $N(t)$ с коэффициентом пропорциональности (скоростью необратимой химической реакции) k ,



и для концентраций (x и y , соответственно) имеем:

$$\frac{dx}{dt} = -kN(t)x, \tag{4.2}$$

$$\frac{dy}{dt} = kN(t)x, \tag{4.3}$$

с начальными условиями $x(0) = x_0$, $y(0) = 0$ и законом сохранения $x + y =$

x_0 , где x_0 – начальная концентрация резазурина; начальная концентрация резорурфина в рассматриваемом случае равна нулю.

Уравнение (4.2) может быть проинтегрировано по методу разделения переменных,

$$\ln \left(\frac{x}{x_0} \right) = -k \int_0^t N(t) dt, \quad (4.4)$$

что дает для концентрации резорурфина в виде

$$y(t) = x_0 \left(1 - e^{-k \int_0^t N(t) dt} \right). \quad (4.5)$$

Из полученного выражения следует, что искомое решение – кинетическая кривая роста концентрации индикатора не совпадает с кривой популяционного роста, а является ее функцией, что может приводить к нетривиальным зависимостям. Одно из простейших специфических особенностей решения (4.5) состоит в том, что оно проявляет зависимость от времени даже в том случае, когда популяция является постоянной по численности, но жизнеспособной. В этом случае $N = N_s = \text{const}$, однако концентрация регистрируемого резорурфина растет, экспоненциально приближаясь к стационару как

$$y(t) = x_0 (1 - e^{-kN_s t}) \quad (4.6)$$

так как благодаря дыхательной активности микроорганизмов продолжается восстановление резазурина в растворе.

Данный факт соответствует известному в фармакологических приложениях [132] различию МИК и стационарной концентрации, при которой скорости роста и гибели организмов сравниваются, приводя к возникновению жизнеспособной популяции, которая при этом является стационарной. Временная зависимость, отраженная в решении (4.6) говорит о том, что оба случая ведут к изменению показаний индикатора и более точный вывод должен базироваться не на факте их роста, а на более точном анализе соответственной функциональной зависимости.

Второй фактор, который необходимо принять во внимание: выход кривой роста индикаторного вещества на стационар может сигнализировать об исчерпании количества индикатора, но не о выходе на стационар роста микробиологической культуры с соответствующим прекращением (или существенном замедлении) ее активности. В случае недостатка индикаторного вещества такая выходящая на насыщение зависимость кривой роста индикатора может быть детектирована даже при экспоненциальной фазе роста популяции, весьма далекой от эффектов насыщения. Подставив $N(t) = N_0 \exp(rt)$ с начальным значением N_0 и константой размножения r в уравнение (4.5), получаем исключительно быстро (двойная экспонента) выходящую на стационар кривую роста индикатора

$$y(t) = x_0 \left(1 - e^{-kN_0[e^{rt}-1]} \right). \quad (4.7)$$

Таким образом, для дальнейшего анализа экспериментальных кривых резазуринового теста, нацеленного на получение количественных характеристик популяционного роста, прежде всего следует установить соответствие между популяционной динамикой и химической кинетикой в случае, когда рост популяции соответствует модели, известной для данного вида микроорганизмов. С одной стороны, такой подход ограничивает возможности экспериментальной проверки, но, одновременно, позволяет провести исследования фундаментального вопроса о воспроизводимости данных о популяционном росте по параметрам колориметрической кривой.

Одной из наиболее общих моделей популяционного роста, применимой к широкому кругу бактериальных популяций является классическое уравнение логистического роста – уравнение Ферхюльста, задающее рост численности популяции дифференциальным уравнением

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{K} \right). \quad (4.8)$$

с начальной численностью $N(0) = N_0$, константой популяционного роста

r , емкостью среды K , и имеющего решение

$$N(t) = \frac{N_0 e^{rt}}{\frac{N_0}{K} (e^{rt} - 1) + 1} \equiv \frac{K e^{rt}}{e^{rt} + (K/N_0 - 1)}. \quad (4.9)$$

Подставляя логистическую функцию (4.9) в решение для концентрации субстрата (4.4), приходим к интегралу

$$\int_0^t N(t) dt = \int_0^t \frac{N_0 e^{rt}}{\frac{N_0}{K} (e^{rt} - 1) + 1} dt,$$

который берется в аналитической форме, и получаем

$$\ln \left(\frac{x}{x_0} \right) = -\frac{kK}{r} \ln \left[\frac{e^{rt} + (K/N_0 - 1)}{K/N_0} \right].$$

В результате, взяв экспоненту от обеих частей равенства, получаем зависимость для концентрации резазурина от времени:

$$x = x_0 \left[\frac{K/N_0}{e^{rt} + (K/N_0 - 1)} \right]^{\frac{kK}{r}}. \quad (4.10)$$

Используя же закон сохранения полной концентрации, выполняющийся для данного шага реакции ($x + y = x_0$), экспериментальное подтверждение чего для концентраций резазурина, соответствующих условиям биофизических экспериментов, представлено во второй главе, для концентрации резорурфина имеем:

$$y = x_0 \left(1 - \left[\frac{K/N_0}{e^{rt} + (K/N_0 - 1)} \right]^{\frac{kK}{r}} \right). \quad (4.11)$$

Очевидно, что решение (4.11) уже не является логистической функцией, что наглядно подтверждает качественное заключение о существенном влиянии протекания химической реакции индикатора для интерпретации регистрируемой кривой колориметрического (или же спектрофотометрического) анализа. Однако кривая роста концентрации индикатора, заданная функцией (4.11), допускает частный случай для комбинации параметров $kK/r = 1$, при котором она существенно упрощается и принимает вид

$$y_V = x_0 \frac{[e^{rt} - 1]}{[e^{rt} - 1] + [(K/N_0 + 1) - 1]}. \quad (4.12)$$

Сравнение формул (4.9) и (4.12) демонстрирует очевидное сходство обоих выражений. Разница состоит в том, что (4.9) содержит зависимость от времени в виде $\exp(rt)$, а (4.12) – в виде $\exp(rt) - 1$. Данный сдвиг на единицу очевиден с той точки зрения, что популяционный рост обязательно начинается с ненулевой численности организмов, а рост концентрации индикатора – продукта химической реакции, изначально отсутствующего в системе – с нуля. Кроме того, в (4.9) максимум численности популяции ограничен емкостью среды K , а в решении (4.12) соответствующий стационар $\max y_V = x_0$ определяется максимальной доступной концентрацией субстрата индикаторной реакции.

Заметим, однако, что экспонента – быстро растущая функция, то есть при прохождении времени, соответствующего нескольким характерным временам удвоения популяции ($T_d = \ln(2)r^{-1}$), ее аргумент будет заметно больше единицы и, соответственно, $\exp rt \gg 1$. Кроме того, для соотношения начальной и максимальной стационарной популяций выполняется условие $K/N_0 \gg 1$ (конечная популяции много больше начальной). Таким образом, для таких времен можно пренебречь сдвигами на единицу в решении (4.12) и получить именно уравнение логистического роста,

$$\tilde{y}_V \approx x_0 \frac{e^{rt}}{e^{rt} + (K/N_0 - 1)}, \quad (4.13)$$

что совпадает с логистическим уравнением популяционного роста с точностью до величины, задающей регистрируемый стационар.

Рис. 4.2 иллюстрирует данные выводы, сопоставляя нормированные кривые, описываемые решением уравнения Ферхюльста (4.9) и решением уравнения популяционно-химической модели (4.12) для различных значений параметра $kK/r = 1$. Для наглядности кривые отнормированы таким образом, чтобы стационарные значения в обоих случаях совпадали.

Видно, что при $kK/r = 1$ кривая роста концентрации резорфуфина практически неотличима от кривой популяционного роста после пример-

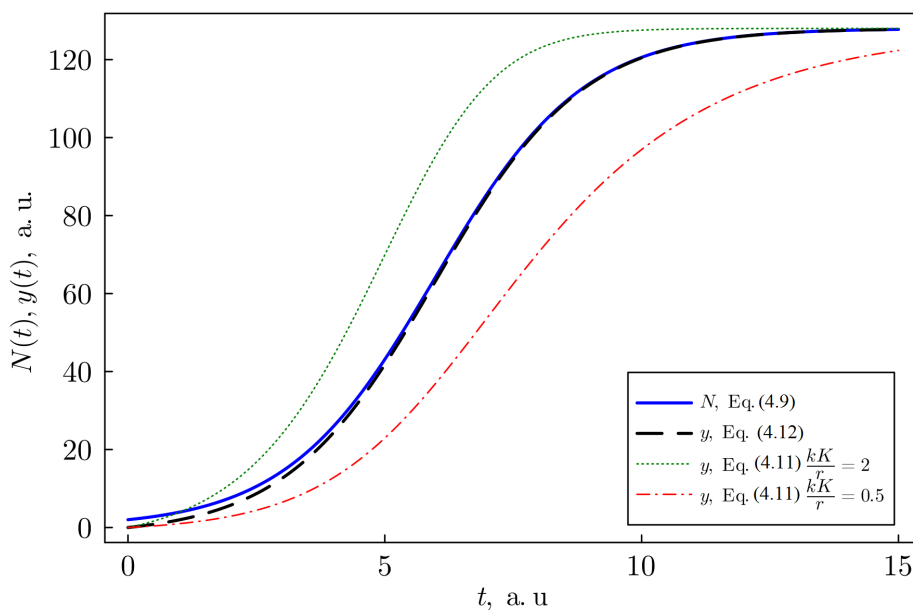


Рис. 4.2. Иллюстрация сравнения хода кинетических кривых популяционного роста и роста регистрируемой концентрации резазурина при различных значениях контролирующего параметра kK/r . Начальные условия $N_0 = 2$, $y(0) = 0$; асимптотические стационарные значения согласованы по величине для наглядности: $K = x_0 = 128$, константа роста $r = \ln(2)$ выбрана таким образом, что характерное время удвоения популяции соответствует единице времени $T_d = 1$.

но трех-пяти циклов клеточного деления. Как следствие, в этом случае можно количественно определить характерную скорость роста популяции непосредственно из регистрируемой кривой роста химического индикатора. Соответствующая регрессия, однако, должна проводиться отбросив начальный участок регистрируемой кривой роста. Характерной особенностью, на которую следует обратить внимание при обработке экспериментальных данных с неизвестными параметрами, должна являться хорошая воспроизводимость данных логистической кривой именно при приближении к стационарному состоянию.

Случай комбинации параметров $kK/r > 1$ отвечает быстрому восстановлению резазурина в резорурфин. В результате этого регистрируемая кривая демонстрирует более резкий рост, чем кривая увеличения численности популяции и более быстрый переход к стационарному состоянию за счет

выработки доступного резазурина. При этом популяционный рост может продолжаться, но уже не регистрироваться.

Напротив, при $kK/r < 1$ наблюдается упомянутый выше (см. уравнение 4.6) эффект стабилизированной жизнеспособной популяции, которая продолжает проявлять дыхательную активность, что приводит к задержке выхода регистрируемой кривой на стационар, так как восстановление еще остающегося в системе резазурина и, соответственно, увеличение количества резоруфина продолжается и после прекращения популяционного роста.

Рассмотренные модельные механизмы ставят задачу исследования их реализуемости в натурном биофизическом эксперименте, которому посвящено дальнейшее рассмотрение.

4.3. Анализ индикации экспериментального роста культуры лактобактерий в контексте популяционно-химической модели

4.3.1. Материалы и методы

Для получения данных о изменении популяционной динамики была выбрана микробная масса живого антагонистически активного штамма лактобактерий (*Lactobacillus plantarum* 8P-A3 или *Lactobacillus fermentum* 90T-C4) (АО НПО «Микроген», Москва, Россия). Выбранные культуры представляют собой лиофилизат, который покрыт защитной средой. Данный слой содержит в себе компоненты питательной среды (желатин, сахароза, молоко), поэтому дополнительные питательные элементы не вводились в реакционную смесь. Для приготовления раствора 250 мл дистиллированной воды кипятили и охлаждали до комнатной температуры, затем добавляли сухие лактобактерии (КОЕ не менее $1 \cdot 10^{10}$ в 15 г лиофилиза-

та). Так как лактобактерии способны образовывать неподвижные колонии, для равномерного распределения микроорганизмов во всем объеме смесь непрерывно перемешивали в течение 30 минут.

Основной раствор натриевой соли резазурина готовили следующим образом: дистиллированную воду кипятили в течение 5 минут и затем охлаждали до (25 ± 2) °С, после чего добавляли (0.055 ± 0.001) г натриевой соли резазурина (Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA), содержание красителя > 75 %). Смесь тщательно перемешивали до полного растворения красителя. Раствор резазурина разбавляли 1 : 3 с дистиллированной водой. Концентрация резазурина в рабочем растворе составляла 0.00067 моль/л.

Для получения фотометрических кривых в течение 72 часов использовали ПМА с временным разрешением регистрации данных каждые 15 мин. В силу существования линейной зависимости между концентрацией резорурфина в среде и регистрируемой освещенностью фотоэлементов в режиме до перехода на этап конверсии резорурфина в дигидрорезорурфин, что обосновано в предыдущей главе, показания прибора отражают изменение количества продукта химической реакции y .

4.3.2. Экспериментальные колориметрические кривые и их анализ

Для более детального изучения соответствия между ростом популяции лактобактерий и его откликом, регистрируемым по колориметрическому отклику индикаторной среды, содержащей резазурин, исследовались системы, содержащие последовательность различных начальных концентраций лактобактерий. Для этого было приготовлено 11 тестовых растворов, содержащих микроорганизмы. Все растворы представляли собой серию разбавлений, начиная от концентрации начальной смеси и заканчивая разбавлением в 11 раз. В качестве 12 раствора использовался чистый водный раствор резазурина, содержащий эквивалентное количество красите-

ля, используемое для анализа.

На рис. 4.3 (А) показан пример цветового изменения индикатора в ряду лунок микробиологического планшета для одного момента времени после начала измерений при условии различной начальной концентрации разведения лактобактерий. Видно, что использованный интервал начальных разведений за 72 часа протекания процесса культивирования приводит к полному набору вариантов отклика колориметрических реакций: от практически неизменного синего цвета контроля через порозовение, до полностью прозрачного раствора, свидетельствующего о полной конверсии исходного вещества до дигидрорезорурфина. В связи с этим следует отметить, что в рамках модели, ограниченной необратимым переходом резазурина в резорурфин, варианты кинетики быстрого обесцвечивания (разведения более чем $(1/7)$) далее количественно не анализируются.

На рис. 4.3 (Б) для каждой из ячеек ряда планшета зеленые и малиновые маркеры отображают показания ПМА, нормированные на величину освещенности в начальный момент времени для коррекции ее вариабельности по площади планшета (таким образом, все кривые на графиках стартуют с единичного значения). Чтобы учесть данную нормировку, $y(0)/y_0 = 1$, при том, что в начальный момент резорурфин в системе отсутствует, фитующие функции были применены со сдвигом на константу d , то есть, например, для модели Ферхюльста

$$\frac{y}{y_0} = \frac{K - d}{1 + e^{-r'(t-t_m)}} + d, \quad (4.14)$$

где t_m – момент времени, при котором достигается значение, равное половине максимального.

Следует учесть, что модель логистического роста (4.14) по определению требует ненулевого (для $y/y_0 - d$) начального значения, так как кинетика Ферхюльста является автокаталитической. Поэтому, при проведении нелинейной регрессии с целевой функцией (4.14), параметр d не фиксирует-

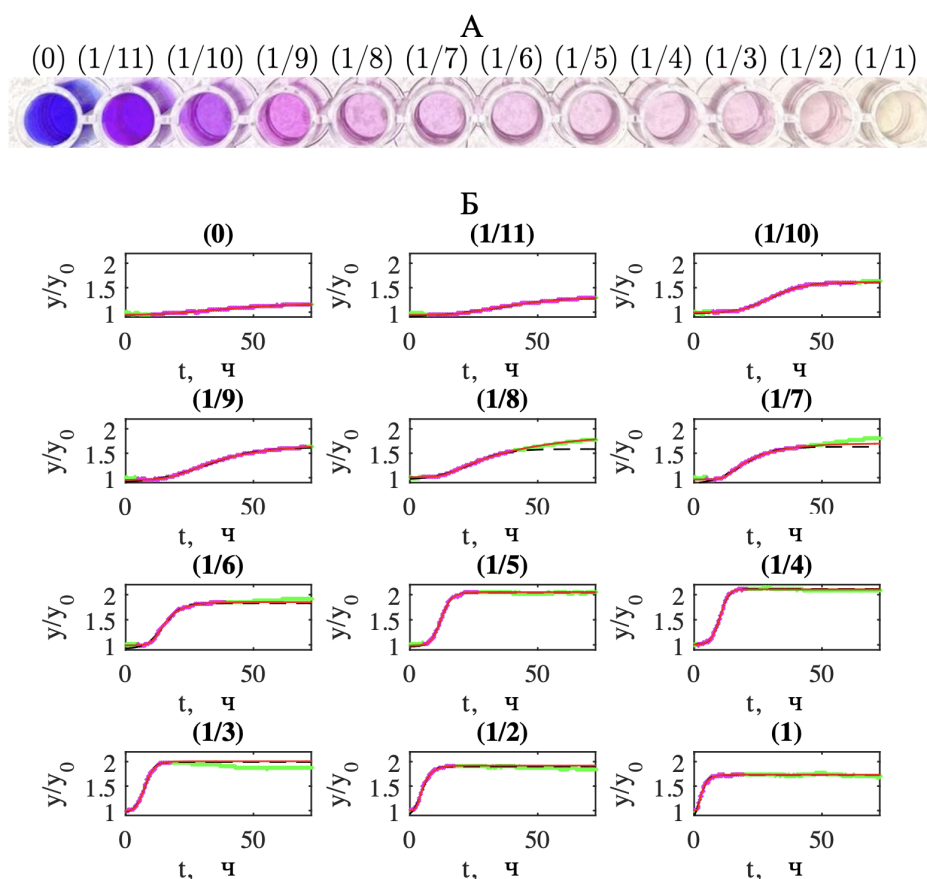


Рис. 4.3. (А) Фотография лунок микробиологического планшета, сделанная через 72 часа после начала эксперимента; над каждой из лунок подписано относительное начальное разведение в долях от $4 \cdot 10^8$ КОЕ; обозначение (0) соответствует резазуриновому контролю без добавления культуры. (Б) Фотометрические данные, полученных с помощью ПМА, нормированные на начальную освещенность (зеленая линия) и ее участок (малиновая линия), использованный для последующей регрессии функциями двух моделей: логистической кривой (черная штриховая линия) и решением уравнения популяционно-химической модели (сплошная красная линия).

ся, а также является параметром, подлежащим определению. Кроме того, из рисунка 4.3 (Б) видно, что в течение первых нескольких часов после начала эксперимента для ряда ячеек планшета детектируется определенное падение освещенности. Это происходит вследствие конденсации испаряющейся жидкости на верхней крышке планшета, что в свою очередь снижает ее прозрачность. После такого переходного периода жидкостно-паровая система приходит в равновесие, и средняя освещенность люксометров при постоянной прозрачности индикаторной среды не меняется, что было про-

верено дополнительными тестовыми экспериментами. По этой причине начальный участок при проведении нелинейной регрессии не использовался, и, помимо этого, данный эффект также мог сказаться на величине параметра d .

Нелинейная регрессия с использованием функции (4.11) также проводится с аддитивным введением сдвига кривой на постоянную величину.

При анализе данных, полученных из эксперимента, видно, что для контрольного раствора характерен небольшой рост (см. рис. 4.3 (Б) для субпанели (0)). Это может объясняться массопереносом небольшого количества веществ-метаболитов, образующихся в процессе жизнедеятельности лактобактерий в соседних рядах (или же компонентов защитной среды исходной культуры) по пленке жидкости, образующейся на крышке планшета в процессе начального испарения, упомянутого выше и в выпадении с избытком конденсата в ячейки ряда, исходно содержащего чистый раствор резазурина. Данные следовые количества способствуют запуску реакции восстановления резазурина, в особенности при воздействии света, регулярно освещающего планшет во время регистрации фотометрических данных [133, 134]. Однако, несмотря на возникший процесс восстановления, он не является существенным по сравнению с ячейками, исходно содержащими достаточно большое количество лактобактерий, и через длительное время выдержки в условиях проведения эксперимента контрольный раствор сохраняет исходный синий цвет, а его колориметрические характеристики подтверждают незначительный рост концентрации резорурфина. Аналогичную динамику можно наблюдать и для раствора с наибольшим разведением (1/11). Так как популяционная плотность в этом случае самая низкая, прогресс роста культуры не наблюдается до того момента, когда колонии бактерий переходят в активную стадию роста, которая наступает примерно через 65 часов. В этот момент их количества достаточно для увеличения заметной динамики жизнедеятельности.

В случаях меньшего разведения, начиная с $(1/10)$, рост лактобактериальных колоний происходит быстрее, в связи с более высокой бактериальной плотностью. В этой ситуации становится явно заметна и вторая стадия реакции (4.1). В этот момент резорурфин начинает разбавляться образующимся в заметном количестве дигидрорезорурфином и жидкость в ячейках планшета начинает приобретать прозрачность. Поэтому для последующей регрессии использована только часть данных, которая отвечает активному процессу, в течение которого происходит в основном только процесс восстановления резазурина до резорурфина. На графиках рис. 4.3 соответствующий интервал данных выделен малиновым цветом.

Подобная динамика наиболее выражена для разведений $(1/10)$ и $(1/9)$ (см. рис. 4.3 (А)), чему соответствует насыщенный розовый цвет растворов на фотографиях соответствующих ячеек на момент выхода кривых на насыщение (см. рис. 4.3 (Б)). В этом случае как решение уравнения химически-популяционной модели, так и решение уравнения Ферхюльста практически полностью накладывалась на кривую динамики роста лактобактерий.

С другой стороны, для разведений $(1/8)$, $(1/7)$ и $(1/6)$ характерна более высокая начальная концентрация микроорганизмов, поэтому фаза быстрого роста возникает раньше, чем в предыдущих случаях. В свою очередь это говорит о том, что стадия восстановления резорурфина до дигидрорезорурфина наступает раньше и будет существенно влиять на дальнейшие изменения колориметрических характеристик исследуемых растворов, то есть кривые роста накладываются на кривые сигмоидальной формы только до определенного момента. При этом кривая роста для разведения $(1/6)$ демонстрирует выход на насыщение как функция (4.11), но фотометрические данные говорят о возникновении новой фазы более быстрого роста. Для этого случая на рис. 4.3 (А) заметно явное изменение оттенка раствора, соответствующее разбавлению раствора за счет появления в нем большего

количества дигидрорезорурфина.

Для оставшихся растворов очевидно возникновение быстрого роста, напоминающего характерный случай отклонения от логистического роста на рис. 4.2. При этом обесцвечивание раствора за счет возникновения резорурфина будет проходить с такой скоростью, что при выходе кривой фотометрического сигнала на насыщение не будет заметна двухэтапность процесса. Стоит также отметить, что в случае начальных разведений $(1/4)$ – $(1/2)$ можно заметить уменьшение интенсивности фотометрического сигнала. Это можно объяснить тем, что из-за большого количества содержащихся и появившихся в растворе лактобактерий происходит его помутнение. Так как к этому моменту все процессы, связанные с восстановлением индикаторов, прекратились и среда становится прозрачной, происходит обычное изменение оптической плотности раствора.

В пределах разрешения графиков рисунок 4.3 (А), кривая (4.14) и сдвинутая кривая 4.11 хорошо фитуют данные, но при этом видно, что значения насыщения существенно (примерно в полтора раза) выше, чем для случая порозовевших ячеек. Однако данные случаи находятся за пределами области применения модели, оперирующей только с одной необратимой реакцией, и далее не будут рассматриваться.

Следует отметить, что видимое разрешение на графиках рисунка 4.3 (Б) достаточно грубое и обсуждение вопроса о воспроизведении сигмоидальных фотометрических кривых роста решением модельных уравнений требует детального типа представления данных, более чувствительного к типу кинетических кривых. Данный анализ представлен на рис. 4.4. Он основан на линеаризации кривой, заданной функцией (4.14) в полулогарифмическом представлении

$$-\ln \left(\frac{K - d}{y/y_0 - d} - 1 \right) = r't_m - r't, \quad (4.15)$$

где сдвиг получившейся прямой $r't_m$ определяется начальными условия-

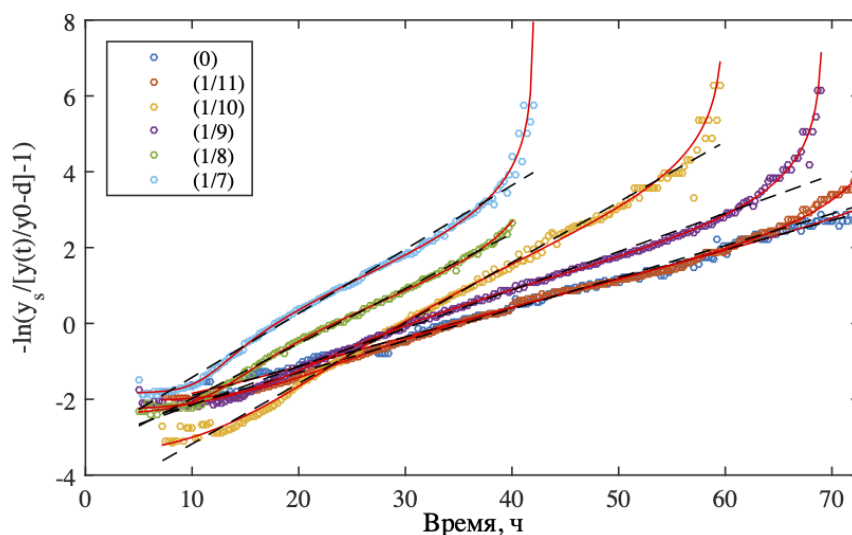


Рис. 4.4. Экспериментальные данные (точки); химическая кинетика резазурина (сплошная линия); уравнение Ферхюльста (прерывистая линия)

ми, а наклон r' задает скорость роста, соответствующую логистическому уравнению.

Рис. 4.4 демонстрирует соответствующий вид данных и их аппроксимаций (на интервале регрессии) для тех лунок, для которых не наблюдается быстрого обесцвечивания за счет второго этапа реакции. В данном представлении существенная приближенность регрессии логистической функцией (4.14) становится явно заметной: даже в центральной области наилучшего приближения маркеры, соответствующие экспериментальным данным, расположены волнообразно вокруг фитующей прямой. На начальном же и конечном участках интервала отклонения пути расположения маркеров от прямой становятся весьма существенными. При этом сплошные линии, отвечающие решению (4.11), принимающему во внимание оба процесса – популяционного роста и химической реакции индикатора – аккуратно проходят по существенно нелинейной кривой расположения экспериментальных данных.

Важно отметить, что даже сходный одинаковый средний наклон аппроксимирующих линейных участков не свидетельствует об одинаковой скорости популяционного роста, определенного двумя методами, хотя и

приводит к одинаковым качественным заключениям. Прежде всего, следует обратить внимание на кривые (0) и (1/11), для которых величина наклонов, во-первых, меньше, чем для прочих, а во-вторых, она практически совпадает для контроля и наибольшего разведения. Это свидетельствует о том, что выдвинутое выше предположение, что повышение фотометрического сигнала для этих ячеек связано не с размножением лактобактерий, а с возможными побочными химическими реакциями. Дополнительный аргумент состоит в том, что для случая (1/11) в конечные моменты времени ($t > 65$ ч) начинается отклонение от прямой вверх, связанное с превышением численности лактобактерий, порога нечувствительности и соответственным влиянием на конверсию резазурина метаболических процессов в жизнеспособных клетках. Дальнейшие зависимости соответствуют ситуации, когда индикаторную реакцию катализируют именно метаболические процессы при росте популяции микроорганизмов, а не сопутствующие вещества в растворе, что видно по тому, что три зависимости – для начальных разведений (1/10), (1/8), (1/7) – проявляют приблизительно одинаковую характерную скорость роста, определяемую близким наклоном прямолинейных участков в полулогарифмических координатах. Параллельный же сдвиг между ними отвечает различным начальным условиям, что полностью соответствует обсуждаемым кинетическим моделям. Меньший наклон для разведения (1/10) может быть связан с индивидуальными особенностями той части культуры, которая попала в данную ячейку (по соответствующему графику на рисунке 4.3 (Б) также видна специфика более медленного роста, все еще не приводящего за 72 ч к началу перехода реакции к этапу появления в растворе дигидрорезорфина).

Однако величина скорости популяционного роста сама по себе различна по данным модели Ферхюльста и более полной популяционно-химической модели. Модель Ферхюльста дает $r' = (0.15 \pm 0.018) \text{ ч}^{-1}$, в то время как модель (4.11) дает значения $r_{(1/10)} = 0.21 \text{ ч}^{-1}$, $r_{(1/8)} = 0.33 \text{ ч}^{-1}$, $r_{(1/7)} =$

0.67 ч⁻¹ при степенных показателях $(kK/r)_{(1/10)} = 0.52$, $(kK/r)_{(1/8)} = 0.13$ и $(kK/r)_{(1/7)} = 0.11$. Таким образом, можно видеть, что эти показатели существенно отличаются от единицы, то есть модель, учитывающая факт регистрации химического процесса, а не размножения микроорганизмов непосредственно, не эквивалентна решению уравнения Ферхюльста, несмотря на сходство динамики в области точки перегиба фиксируемой кривой роста, где оба типа кривых, в принципе, близки к линейному росту на ограниченном интервале времени. С этой точки зрения, более существенным является различие на этапах начала и конца роста индикаторной кривой конверсии резазурина в резорурфин, где две функциональные формы проявляют качественно различные свойства.

Одним из факторов, обуславливающих различие в скоростях популяционного роста для различных начальных разведений, является различная концентрация питательной среды, которая добавлялась вместе с культурой и разводилась в той же пропорции, то есть концентрация в расчете на объем ячейки планшета различалась, возрастая от ячейки (1/10) до (1/7). Другим существенным фактором является возможная зависимость от начальной концентрации лактобактерий в силу влияния последней на продолжительность лаг-фазы динамики роста [135]. Современные исследования [136, 137] аргументируют также существование необходимости учета эффекта кворума, следствием которого является меньшая характерная скорость роста культуры за счет продления лаг-фазы при малых концентрациях колониеобразующих единиц, что соответствует увеличению констант от $r_{(1/10)}$ до $r_{(1/7)}$.

Вместе с тем значения этих констант соответствуют интервалу величин, найденных в ряде известных работ, обращавшихся к непосредственному подсчету колониеобразующих единиц лактобактерий или же оптической плотности их взвеси, предварительно откалиброванной на значения при прямом подсчете. Для температурного интервала (20 – 30)°С, соот-

ветствующего нашему эксперименту, параметр роста варьируется в интервале $(0.30 - 0.65) \text{ ч}^{-1}$ [138, 139] в зависимости от условий среды роста, что соответствует $r_{(1/8)}$ и $r_{(1/7)} = 0.67$ с учетом наличия экспериментальной погрешности. Величина $r_{(1/10)}$ находится ниже этого интервала, но, с учетом отмеченного выше эффекта снижения скорости роста при больших начальных разведениях и вариабельности роста в целом, рассогласование не является критичным. Вместе с тем применение модели Ферхюльста дает существенно заниженное значение, что свидетельствует в пользу релевантности именно модифицированного подхода, базирующегося на полуляционно-химической модели.

4.4. Исследование динамики роста микобактериальной культуры

В ходе исследований [140] культуры микобактерий *M. tuberculosis*, штамм H37Rv, растущего в условиях стандартного протокола [141, 142], при помощи высокоточной системы ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson), было обнаружено, что кривые роста при высокочастотном (с временным шагом 1 час) непрерывном мониторинге флуоресценции на определенном временном интервале складывались из последовательности повторяющихся вогнутых вверх кривых (4.6); на классическую кривую Ферхюльста роста микроорганизмов укладываются только их начальные и конечные точки.

Характерный пример такой динамики приведен на рис. 4.5 А, соответствующему ситуации с начальной концентрацией инокулята 7.5×10^6 клеток/мл. Для того, чтобы подчеркнуть характер данной нетривиальной динамики, на рис. 4.5 Б показана зависимость для первой производной зарегистрированной кривой роста, рассчитанной как конечная разность с шагом

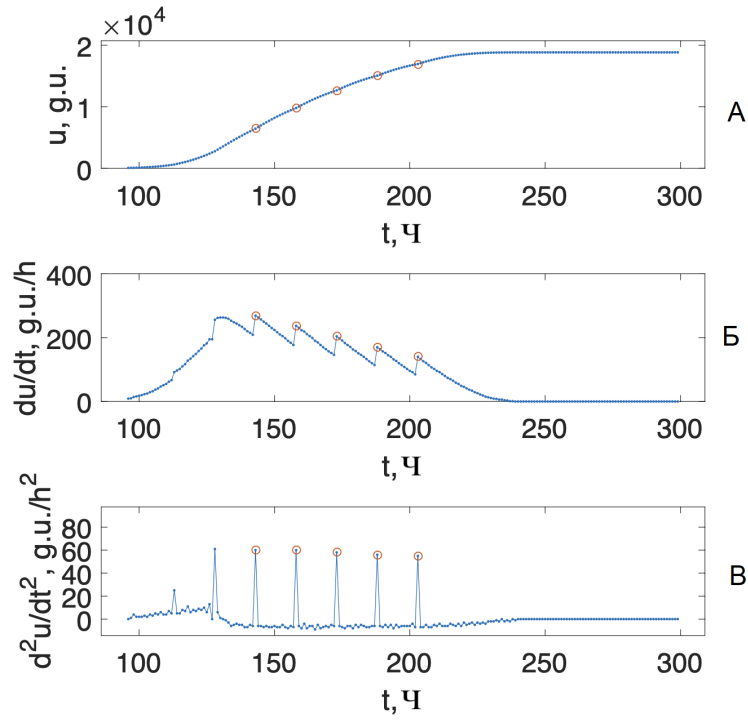


Рис. 4.5. Временная зависимость интенсивности флуоресценции, отражающая рост культуры *M. tuberculosis* в стандартных условиях тестирования системы ВАСТЕС MGIT 960 (А), где кружками выделены точки перелома монотонного роста, а также первая (Б) и вторая (В) производные этой кривой роста по времени; здесь g.u. означает "единицы роста" ВАСТЕС.

по времени $\Delta t = 1$ ч

$$\Delta u(t_n) = u(t_{n+1}) - u(t_n) \approx du/dt \quad (4.16)$$

и на рис. 4.5 Б – вторая производная

$$\Delta^2 u(t_n) = u(t_{n-1}) - 2u(t_n) + u(t_{n+1}) \approx d^2 u/dt^2. \quad (4.17)$$

Они задают локальные скорость и ускорение роста, измеряемые в единицах роста $g.u. h^{-1}$ и в единицах роста $g.u. h^{-2}$ соответственно.

Для каждой периодически повторяющейся стадии роста будет характерен резкий скачок, за которым следует практически линейный спад скорости роста. Локализация этих скачков легко осуществляется путем рассмотрения второй конечной разности (4.17), которая демонстрирует набор выбросов, где соответствующие точки выделены маркерами. Такими же

маркерами подразделяется исходная кривая сигнала, полученного при помощи ВАСТЕС MGIT 960 (см. рис. 4.5 А). Видно, что временные расстояния между этими выбросами в режиме роста, который начинается через некоторое переходное время и продолжается до последней стадии роста перед насыщением, достаточно стабильны и равны $T_d = 15$ часов. Абсолютная погрешность определения этой величины составляет $\Delta T_d = 1$ час, что следует из частоты измерений данных. Следует отметить, что эта величина весьма близка к значению периода деления *M. tuberculosis* в наиболее благоприятных условиях для роста культуры. Таким образом, можно высказать предположение, что данная особенность зарегистрированной кривой флуоресценции свидетельствует в пользу того, что бактерии в культуре находятся в режиме синхронизированного роста и деления. Однако, в силу того что высокочастотные измерения флуоресценции с использованием ВАСТЕС MGIT 960 являются экспериментальным подходом, практически не исследованным в настоящее время, следует исключить возможность того, что данная немонотонность возникает как технический артефакт. Для этой цели был применен альтернативный экспериментальный метод – колориметрическая индикация роста при помощи ПМА с использованием резазурина как индикаторной среды.

4.4.1. Колориметрический подход к детектированию

особенностей динамики роста культуры *M. tuberculosis*

Методика проведения эксперимента с культурой микобактерий соответствовала описанной выше с использованием ПМА для регистрации изменения фотометрического сигнала (с временным шагом в 15 мин) из-за цветового перехода резазурина в резорурфин. Исходная концентрация инокулята была такой же, как и при проведении эксперимента на оборудовании ВАСТЕС MGIT 960 в условиях возникновения эффекта периодизации кривых роста. Следует отметить, что в данном эксперименте наблюдалась

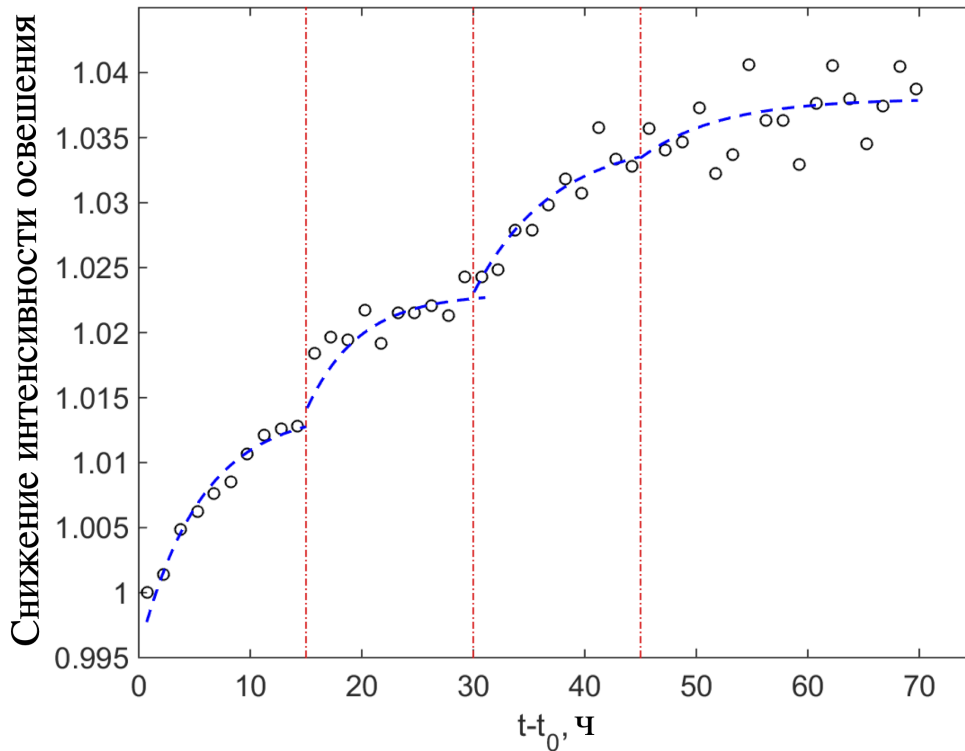


Рис. 4.6. Фотометрические данные, отражающие рост *M. tuberculosis* в лунках ряда микробиологического планшета (маркеры – кружки) и аппроксимация усредненной кривой роста последовательностью локальных по времени выходящих на насыщение кривых (штриховая линия).

достаточно сильная вариабельность регистрируемого сигнала, поэтому на рис. 4.6 маркерами-кружками показаны полученные экспериментальные данные, усредненные по 6 последовательным измерениям (т.е. за временные интервалы в 1.5 часа). Данные представлены в нормировке по отношению к начальному сигналу для каждой ячейки микробиологического планшета (нормировка проводилась до процедуры усреднения), чтобы избежать дополнительной вариабельности из-за возможной неравномерности освещения ячеек. Для наглядности нулевая точка временного интервала смещена таким образом, что $t = t_0$ соответствует началу обнаруживаемого изменения цвета, ≈ 3 суткам.

По экспериментальным данным, представленным на рис. 4.6 видно, скорость роста регистрируемого фотометрического сигнала не являет-

ся монотонной, как и в случае регистрации флуоресценции при помощи ВАСТЕС MGIT 960 как показано на рис. 4.5 А. Чтобы подчеркнуть тренд выявленной периодичности, он показан штриховой линией, полученной регрессией данных на подынтервалах, разделенных вертикальными штрихпунктирными линиями, по методу наименьших квадратов отклонения от функции вида (4.6). Идентифицированная периодичность в 15 часов соответствует таковой, полученной для данных ВАСТЕС MGIT 960, равно как и эффект уменьшения величины прироста за период, по мере приближения к стационарному состоянию.

Однако, в связи с большим рассеянием фотоколориметрических данных количественные значения коэффициентов регрессии в данном случае будут малоинформативны. Более важными будут качественные выводы, которые можно сделать на основе обоих типов экспериментов. Прежде всего, следует заметить, что хотя оба подхода (с использованием ВАСТЕС MGIT 960 и ПМА) являются косвенной индикацией процесса роста культуры микроорганизмов, принцип их действия основан на различных химических процессах, хотя их протекание индуцируется сходной биологической активностью клеток. В случае ВАСТЕС MGIT 960, в экспериментальный флакон на его дно нанесено вещество, флуоресценция которого подавляется растворенным в культурной среде кислородом. Соответственно, в процессе жизнедеятельности аэробных бактерий *M. tuberculosis* в закрытом флаконе кислород поглощается из раствора из-за дыхательной активности микобактерий, и обедненная среда перестает препятствовать возбуждению флуоресценции фиксированного количества индикатора, находящегося за пределами клеток бактерий. В случае резазуринового теста цветовой переход соответствует производству резоруфина, первоначально отсутствующего в растворе, причем этот процесс катализируется непосредственно в дыхательной цепи внутри клетки. Таким образом, инструментальные погрешности, которые могут возникать в процессе измерения, будут иметь

разную природу. Однако эксперимент показывает, что в обоих случаях наблюдается один тип периодизированного роста с одним и тем же периодом в 15 суток. Более того, этот период соответствует данным прямого молекулярно-биологического анализа – процесса репликации микобактерий туберкулеза в благоприятных для их роста условиях [143]. Используемые в цитируемой работе для этой цели профили синтеза ДНК имеют также вид, качественно схожий с кривыми на рис. 4.6. При этом указанный эксперимент проводился в условиях, когда культура специальным образом (в частности, путем холодового стресса) вводилась в режим синхронной репликации. Таким образом, можно сделать вывод, что наблюдаемая в нашей работе картина также соответствует возникновению режима синхронного роста и деления микобактериальной культуры, однако, в данном случае возникновение синхронизации является спонтанным. Более детальный анализ соответствия наблюдаемой картины такому механизму будет рассмотрен далее.

4.4.2. Моделирование процесса роста микобактерий на основе экспериментальных данных

Анализ экспериментальных данных, полученных как при помощи ВАСТЕС MGIT 960, так и с использованием колориметрического реззуринового теста с применением ПМА показал, что рост культуры *M. tuberculosis* H37Rv в жидкой среде Middlebrook 7H9 может проявлять эффект спонтанной синхронизации. Он заключается в том, что бактериальная культура, не подвергшаяся специальному воздействию, нацеленному на установление синхронного начала клеточного деления, тем не менее способна входить в данный режим по прошествии определенного времени после начала эксперимента. Анализ условий серии экспериментов, представленных в работе [140], показывает, что данный феномен наблюдается при достаточно большой начальной концентрации культуры и не пропадает при

ее разбавлении.

Таким образом, можно предположить, что в возникновении синхронизации существенную роль играет эффект кворума, так как типичным свойством микобактерий является образование достаточно плотных агломератов и бактериальных пленок в ячейках, используемых в примененных устройствах детектирования роста культуры. Соответственно, физиологические процессы в таких образованиях синхронизированы, причем степень синхронизации за счет колониеобразования превышает эффекты стохастической вариации свойств отдельных бактерий и их малых колоний. Однако, о наличии подобной вариабельности свидетельствует два фактора: постепенное сглаживание кривой роста после нескольких характерных времен деления (то есть с увеличением популяции и, соответственно, ее разнообразия, стохастические эффекты начинают “размывать” синхронную динамику) и гладкость кривой роста при малых начальных концентрациях (т.е. таких, которые слишком малы для кворумной самоорганизации).

Помимо этого, требует прояснения вопрос о форме кривых роста, регистрируемых как ВАСТЕС MGIT 960, так и ПМА – их формы, как показано при построении рис. 4.6, математически соответствующих уравнению (4.7), которое является решением связанной химически-популяционной модели для постоянного количества жизнеспособных клеток. Она также поддерживает идею синхронного деления – между скачками производной величина популяции сохраняется, и переход к новому циклу осуществляется путем синхронного деления клеток; в промежутке же, регистрируемый сигнал соответствует химической реакции индикатора, катализируемой жизнеспособными организмами, но не популяционному росту.

Для верификации картины, представленной выше, рассматривается следующая модель: численность популяции n_j в j -м поколении задается

итерационной схемой

$$n_{j+1} = n_j + \sum_{m=1}^{n_j} w_m(n_j); \quad n_0 = 1, \quad (4.18)$$

с вероятностным условием деления клеток

$$w(n_j) = \Theta \left[\left(1 - \frac{n_j - 1}{K} \right) - \xi \right], \quad (4.19)$$

где $\Theta(\cdot)$ – функция Хевисайда, равна единице, когда ее аргумент больше нуля, когда он меньше или равен нулю, а ξ – положительное случайное число с плотностью вероятности, равномерно распределенной между нулем и единицей. В начальный момент времени $n_1 = 1$ первый член в аргументе функции Хевисайда равен $1 - \xi$, то есть положителен и происходит удвоение популяции. С ее ростом, величина $1 - n_j - 1/K$ убывает, и, соответственно, появляется возможность того, что аргумент функции $\Theta(\cdot)$ может оказаться отрицательным, то есть деления не произойдет. Вероятность такого исхода растет с увеличением n_j , пока при $n_j = K + 1$ не придет к ситуации $\Theta(-\xi) \equiv 0$. В этот момент деление прекращается, и система выходит на насыщение со стабильной популяцией.

Описанная выше ситуация оперирует с численностью популяции, пронумерованной поколениями. Чтобы перейти к непрерывной функции времени, достаточно заполнить промежутки между моментами деления постоянной функцией времени (прямоугольным сдвигающимся окном), которая также может быть сформирована из функций Хевисайда как

$$u_{T,j}(t) = \Theta(t - T \cdot j) - \Theta(t - T \cdot (j + 1)), \quad (4.20)$$

где T – период деления клеток. Чтобы учесть его вариабельность, он также рассматривается как случайная величина, удовлетворяющая Гамма-распределению (такой выбор обосновывается известным анализом стохастичности процесса деления микроорганизмом [144])

$$p(T, k, \theta) = \frac{1}{\Gamma(k)\theta^k} T^{k-1} e^{-\frac{T}{\theta}}. \quad (4.21)$$

со средним периодом T (в случае *M. tuberculosis* принято значение $\langle T \rangle = 15$ часов) и параметрами $k = (\langle T \rangle / \sigma)^2$ и $\theta = \sigma^2 / \langle T \rangle$, определяемыми средним периодом удвоения популяции и его среднеквадратичным отклонением σ , которое, в свою очередь, характеризует степень десинхронизации между отдельными клетками (полностью синхронный режим соответствует случаю $\sigma = 0$).

Таким образом, искомое уравнение популяционного роста в реальных единицах времени принимает вид

$$N_j(t) = N_{j-1}(t) + n_{j-1} u_{T,j}(t). \quad (4.22)$$

Следует отметить, что модель (4.18)–(4.22) в определенной степени представляет собой обобщение модели "время-зрелость-Рубинова [144], в которой процесс роста популяции складывается из интервалов постоянного размера (но с ростом "зрелости" клеток) между делениями, которые приводят к удвоению популяции и "перезапуску" изменения зрелости. В модели Рубинова, как и в ее обобщении на случай популяционной модели Гомперца для роста с насыщением [145] десинхронизация, приводящая к сглаживанию кривой роста достигается за счет вероятностного распределения скоростей индивидуального роста клеток, сама же модель остается динамической. В нашем случае сам процесс размножения каждой индивидуальной клетки рассматривается как вероятностный, что дает более микроскопически-основанное моделирование процесса.

В качестве финального этапа следует дополнить популяционную модель (4.18)–(4.22) химическим компонентом, отвечающим за непосредственно регистрируемую кривую, порождаемую либо появлением индикатора-резорурфина в резазуриновом тесте, либо появлением флуоресценции индикаторного вещества в системе ВАСТЕС MGIT 960. Как и выше, используем химическую кинетику первого порядка – уравнения (4.2)–(4.2), валидность которых обоснована для резазуринового теста и которые могут

быть использованы также как разумное приближение для случая реакции перехода индикаторной среды ВАСТЕС во флуоресцирующее состояние.

То есть, решение, данное уравнением (4.22), подставляется в зависимость

$$S(t) = S_0 \left[1 - \exp \left(-k_c \int_0^t N(t) dt \right) \right], \quad (4.23)$$

и проводится процедура минимизации отклонений между соответствующими расчетными данными и экспериментальными данными, зарегистрированными ВАСТЕС MGIT 960; для наилучшего приближения определяются значения среднеквадратичного отклонения для вероятностного распределения (4.21) периодов деления микобактерий (что характеризует степень синхронизации) и кинетической константы химической реакции k_c в уравнении (4.23).

На рис. 4.7 представлено сравнение результатов данного моделирования в сравнении с экспериментом для случая двух существенно различных начальных концентраций микобактерий, которые демонстрируют качественно различное поведение (наличие и отсутствие синхронизации). Все экспериментальные данные показаны в виде красных кривых в безразмерном виде в относительных единицах (г.у.), полученных путем нормировки на величину насыщения сигнала S_0 . Это сделано для лучшей сопоставимости кривых с разными абсолютными значениями флуоресценции.

Видно, что высокая начальная концентрация микобактерий приводит к ступенчатой кривой роста (А). Этот случай отвечает среднему периоду клеточного деления, зафиксированному как $\langle T \rangle = 15$ ч и безразмерной кинетической константе $k_c = 0.175$. Соответствующее значение среднеквадратичного отклонения периодов деления от его среднего значения составляет $\sigma = 0.001$ ч, что соответствует крайне высокой степени синхронизации.

Полученная модельная кривая хорошо совпадает с экспериментальной на большей части временного хода, когда относительная величина сигнала

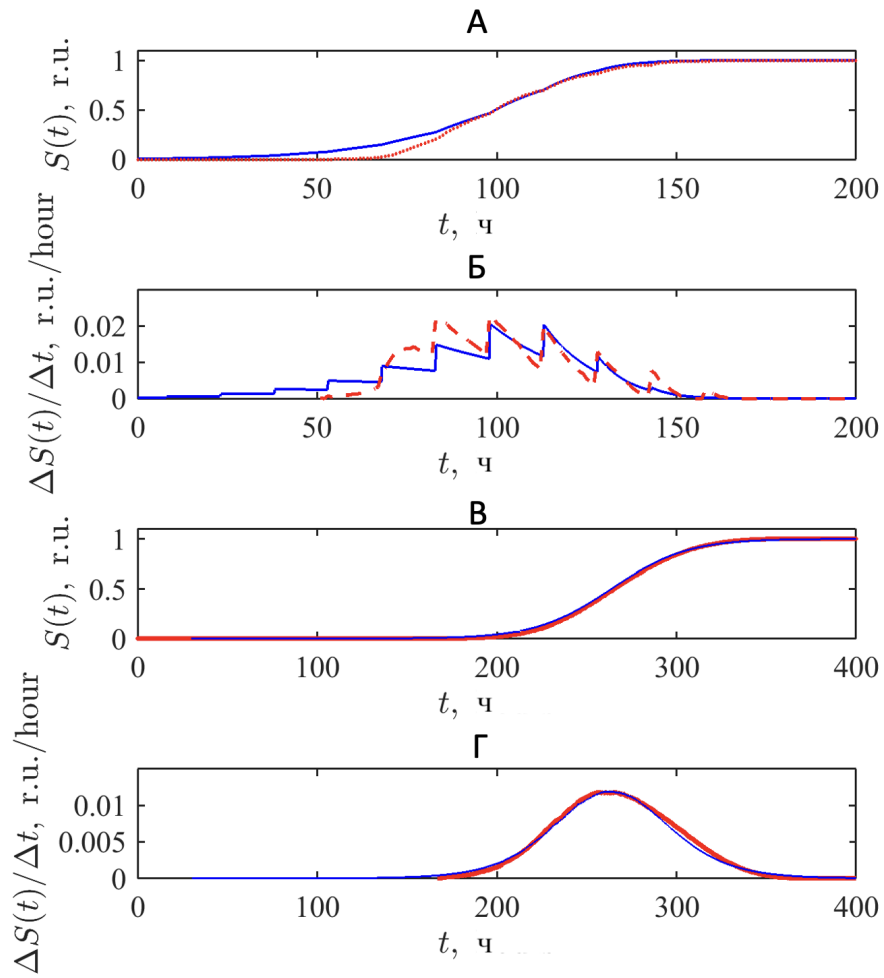


Рис. 4.7. Сравнение нормированных экспериментальных сигналов системы ВАСТЕС MGIT 960, регистрирующих рост культуры *M. tuberculosis* (красные линии), и результатов моделирования (синие линии). На панелях (А)–(Б) изображены кривая роста и ее производная для начальной концентрации $7.5 \cdot 10^6$ клеток/мл, а на панелях (В)–(Г) те же величины представлены для начальной концентрации $7.5 \cdot 10^4$ клеток/мл.)

$S > 0 > 25$, т.е. на большей части кривой, стремящейся к насыщению. На начальном интервале роста она завышена, что можно объяснить упрощением уравнения (4.23) как описания возбуждения флуоресценции, которое инициируется медленнее, и учетом конечного начала регистрации установки.

Этот эффект подчеркивает кривая (Б), где представлена численная производная этой последовательности роста. Аккуратность воспроизведения подтверждается сравнением производных кривых, как более чувствительных к малым отклонениям. И экспериментальные, и модельные кри-

вые имеют одинаковую "пилообразную" форму с совпадающими величинами во второй половине интервала времени роста. Но и в первой половине этого интервала наблюдается тот же стадийный тип функций, несмотря на худшее количественное соответствие.

Разбавление исходного посевного материала в 100 раз приводит к задержке флуоресцентного отклика на рост бактерий и сглаживанию кривой сигнала (В). Т.к. в этот момент культура представляет собой сильно разбавленный раствор, это разбавление разрушает синхронизацию, что подтверждается тем, что при том же среднем периоде клеточного деления в $\langle T \rangle = 15$ ч согласование с экспериментальной кривой достигается при гамма-распределенном по периодам деления ансамбля клеток со среднеквадратичным отклонением $\sigma = 1.5$ ч, то есть с разбросом на три порядка большим, чем при предыдущем (синхронизированном) случае. При моделировании было использовано 10^3 реализаций и проверено, что увеличение размера группы не изменяет выходной картины. В данном случае использовалась кинетическая константа $k_c = 0.05$ (ее значение меньше, чем раньше, так как нормализующая величина сигнала при насыщении тоже меньше) приводит к почти полному совпадению экспериментальных и модельных кривых, которые едва различимы.

Это подтверждается и формой ее производной (Г). Практическое следствие сглаживания кривых, возникающего из-за вариаций во времени генерации, подтверждает биофизическую интерпретацию изменения формы кривой роста микобактерий как эффекта популяционной десинхронизации.

4.5. Выводы по главе

- Колориметрический метод позволяет характеризовать кинетику популяционного роста культуры микроорганизмов в жидкой среде, однако установление количественной величины скорости роста популя-

ции существенно зависит от комплексного соотношения скорости роста популяции, константы химической реакции перехода резазурина в резорурфин, емкости среды, а также соотношения концентраций микроорганизмов и индикаторных реагентов в измерительной ячейке.

- Выявлено, что для микроорганизмов, активно образующих колонии и бактериальные пленки, в частности *M. tuberculosis*, различная концентрация начальной культуры может приводить к качественному изменению кривой роста, которая приобретает ступенчатый характер, происхождение которого интерпретируется как следствие спонтанной синхронизации роста и деления; данный факт подтверждается экспериментальными результатами, полученными двумя независимыми методами – по данным флуоресценции в системе ВАСТЕС MGIT 960 и по данным резазуринового теста, измеренным фотометрически при помощи портативного микробиологического анализатора.
- Показано, что ход регистрируемых кривых роста микобактериальной культуры в условиях возникновения синхронизации и ее разрушения при растущем степенности стохастичности параметров роста индивидуальных колониеобразующих единиц может быть количественно воспроизведен моделью связанных популяционных и химических процессов.

Материал, изложенный в главе, соответствует публикациям [146, 140, 147, 148, 149].

Заключение

Таким образом, по результатам исследований, проведенных в ходе данной работы, можно сделать следующие основные выводы.

1. В условиях, соответствующих стандартному протоколу микробиологического исследования роста жизнеспособной микробной среды REMA, интервал изменения цвета резазурин-резорфуфиновой смеси отвечает линейной зависимости между концентрацией резорфуфина, образующегося вследствие клеточного дыхания, и величиной значения в цветовом канале a^* цветовой схемы $CIE L^*a^*b^*$ при постоянстве значений в каналах L^* и b^* , что делает возможным взаимно-однозначное отображение между индикатором активности микроорганизмов и данной колориметрической характеристикой регистрируемого сигнала.
2. Установленная закономерность, указанная выше, позволяет, помимо колориметрической обработки цифровых цветных изображений, модифицировать устройство портативного микробиологического анализатора, работающего с 96-луночными микробиологическими планшетами, путем введения светофильтра с цветом в системе $CIE L^*a^*b^*$, дополнительным к цвету резазурина таким образом, что измеряемая интенсивность света проходящего через лунки линейно соответствует индикатору жизнедеятельности микроорганизмов. Данный подход верифицирован при определении минимальной ингибирующей концентрации лекарственного препарата изониазида, действующего на штамм H37Rv лабораторной культуры *M. tuberculosis*.
3. Разработанный метод колориметрического анализа, прошедший калибровку на примере определения МИК ряда известных антитуберкулезных препаратов, действующих на лабораторный штамм *M.*

tuberculosis H37Rv, успешно применен для установления МИК при воздействии на клинические антибиотико-резистентные штаммы микобактерий четырьмя новосинтезированными веществами нитрофуранового ряда, рассматриваемыми как перспективные в качестве лекарственных средств.

4. Результаты фотометрических измерений, проведенных при помощи портативного микробиологического анализатора и разработанной методики, совместно с данными альтернативных измерений на стандартной флуориметрической системе ВАСТЕС MGIT 960, позволили экспериментально установить существование эффекта спонтанной синхронизации роста и деления в высоконцентрированных колониеобразующих культурах микобактерий *M. tuberculosis* растущих в жидкой среде.
5. На основе разработанных подходов экспериментально показано, что динамика индикатора роста культуры жизнеспособных микроорганизмов в резазуриновом тесте совпадает с кривой популяционного роста только при специальном согласовании констант размножения микроорганизмов, катализируемой их дыхательной активностью индикаторной химической реакции и емкости среды. В общем же случае анализ данных должен включать композитную модель, учитывающую связанные биологические и химические процессы. Данный вывод подтвержден на примерах роста культуры лактобактерий с непрерывной скоростью и микобактериальной культуре с эффектом скачкообразных приращений, связанных с наличием синхронизации деления клеток.

Список литературы

1. Kumar S. S., Ghosh A. R. Assessment of bacterial viability: a comprehensive review on recent advances and challenges // *Microbiology*. 2019. Vol. 165. P. 593–610.
2. A review of methods to determine viability, vitality, and metabolic rates in microbiology / Braissant O., Astasov-Frauenhoffer M., Waltimo T., and Bonkat G. // *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 547458.
3. Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016. Vol. 6. P. 71–79.
4. Hossain T. J. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations // *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2024. Vol. 14. P. 97–115.
5. Mabhula A., Singh V. Drug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: where we stand // *Medchemcomm*. 2019. Vol. 10, no. 8. P. 1342–1360.
6. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / Singh R., Dwivedi S. P., Gaharwar U. S., Meena R., Rajamani P., and Prasad T. // *Journal of applied microbiology*. 2020. Vol. 128, no. 6. P. 1547–1567.
7. Organization World Health et al. WHO guidelines on tuberculosis infection prevention and control: 2019 update. No. WHO/CDS/TB/2019.1. World Health Organization, 2019.
8. Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis / Gegia M., Winters N., Benedetti A., van Soolingen D., and Menzies D. // *The Lancet Infectious Diseases*. 2017. Vol. 17, no. 2. P. 223–234.
9. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes / Huyen M. N. T., Cobelens F. G. J.,

- Buu T. N., Lan N. T. N, Dung N. H., Kremer K., Tiemersma E. W., and van Soolingen D. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013. Vol. 57, no. 8. P. 3620–3627.
10. Drug resistance of *M. tuberculosis* (historical aspects, current level of knowledge) / Burmistrova I.A., Samoylova A.G., Tyulkova T.E., Vaniev E.V., Balasanyants G.S., and Vasilyeva I.A. // *Tuberculosis and lung diseases*. 2020. Vol. 98, no. 1. P. 54–61.
 11. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis / Gandhi N.R., Nunn P., Dheda K., Schaaf H. S., Zignol M., Van Soolingen D., Jensen P., and Bayona J. // *The Lancet*. 2010. Vol. 375, no. 9728. P. 1830–1843.
 12. Global tuberculosis report 2023. Geneva, Switzerland : World Health Organization, 2023.
 13. Primm T. P., Franzblau S. G. Recent advances in methodologies for the discovery of antimycobacterial drugs // *Current Bioactive Compounds*. 2007. Vol. 3. P. 201–208.
 14. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / Hoagland D. T., Liu J., Lee R. B., and Lee R. E. // *Advanced drug delivery reviews*. 2016. Vol. 102. P. 55–72.
 15. Bahuguna A., Rawat D. S. An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets // *Medicinal research reviews*. 2020. Vol. 40, no. 1. P. 263–292.
 16. Hett E. C., Rubin E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2008. Vol. 72. P. 126–156.
 17. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility / Aldridge B. B., Fernandez-Suarez M., Heller D., Ambravaneswaran V., Irimia D., Toner M., and Fortune S. M. // *Science*. 2012. Vol. 335, no. 6064. P. 100–104.

18. Baranowski C., Rego E. H., Rubin E. J. The dream of a *Mycobacterium* // Microbiology Spectrum. 2019. Vol. 7. P. 10–1128.
19. James B. W., Williams A., Marsh P. D. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium // Journal of Applied Microbiology. 2000. Vol. 88. P. 669–677.
20. Vishnevskiy N., Yablonskiy P. Quorum sensing in *Mycobacterium tuberculosis*. Review // MedAlliance. 2021. Vol. 9, no. 3. P. 6–11.
21. Wayne L. G. Synchronized replication of *Mycobacterium tuberculosis* // Infection and Immunity. 1977. Vol. 17, no. 3. P. 528–530.
22. Synchronization of *Mycobacterium* life cycle: A possible novel mechanism of antimycobacterial drug resistance evolution and its manipulation / Verma H., Chauhan A., Kumar A., Kumar M., and Kanchan K. // Life Sciences. 2024. Vol. 346. P. 122632.
23. Fundamental principles in bacterial physiology—history, recent progress, and the future with focus on cell size control: a review / Jun S., Si F., Pugatch R., and Scott M. // Reports on Progress in Physics. 2018. Vol. 81. P. 056601.
24. Ghenu A.-H., Marrec L., Bank C. Challenges and pitfalls of inferring microbial growth rates from lab cultures // Frontiers in Ecology and Evolution. 2024. Vol. 11. P. 1313500.
25. Monod J. The growth of bacterial cultures // Annual Review of Microbiology. 1949. Vol. 3. P. 371–394.
26. Kurokawa M., Ying B.-W. Precise, high-throughput analysis of bacterial growth // JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2017. no. 127. P. e56197.
27. General calibration of microbial growth in microplate readers / Stevenson K., McVey A. F., Clark I. B. N., Swain P. S., and Pilizota T. // Scientific reports. 2016. Vol. 6. P. 38828.

28. Mira P., Yeh P., Hall B. G. Estimating microbial population data from optical density // PLoS One. 2022. Vol. 17, no. 10. P. e0276040.
29. Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth: a correlation of the optical measurements with colony forming units / Peñuelas-Urquides K., Villarreal-Treviño L., Silva-Ramírez B., Rivadeneyra-Espinoza L., Said-Fernández S., and de León M. B. // Brazilian Journal of Microbiology. 2013. Vol. 44. P. 287–290.
30. Photoinactivation of dormant *Mycobacterium smegmatis* due to its endogenous porphyrins / Shleeva M. O., Savitsky A. P., Nikitushkin V. D., Solovyev I. D., Kazachkina N. I., Perevarov V. V., and Kaprelyants A. S. // Applied Microbiology and Biotechnology. 2019. Vol. 103. P. 9687–9695.
31. Shleeva M., Savitsky A., Kaprelyants A. Photoinactivation of mycobacteria to combat infection diseases: Current state and perspectives // Applied Microbiology and Biotechnology. 2021. Vol. 105. P. 4099–4109.
32. Acquiring of photosensitivity by *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and inside infected macrophages is associated with accumulation of endogenous Zn-porphyrins / Shleeva M. O., Linge I. A., Gligonov I. A., Vostroknutova G. N., Shashin D. M., Tsedilin A. M., Apt A. S., Kaprelyants A. S., and Savitsky A. P. // Scientific Reports. 2024. Vol. 14. P. 846.
33. Deepa N., Ganesh A. B. Minimally invasive fluorescence sensing system for real-time monitoring of bacterial cell cultivation // Instrumentation Science & Technology. 2017. Vol. 45, no. 1. P. 85–100.
34. Integration and application of optical chemical sensors in microbioreactors / Gruber P., Marques M. P. C., Szita N., and Mayr T. // Lab on a Chip. 2017. Vol. 17. P. 2693–2712.
35. Ayyash S., Wu W.-I., Selvaganapathy P. R. Fast and inexpensive

- detection of bacterial viability and drug effectiveness through metabolic monitoring // *Sensors*. 2016. Vol. 16, no. 11. P. 1879.
36. Greig M. E., Hoogerheide J. C. The correlation of bacterial growth with oxygen consumption // *Journal of Bacteriology*. 1941. Vol. 41, no. 5. P. 549–556.
 37. Microbial sensor for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* / Zhang Z.-T., Wang D.-B., Li C.-Y., Deng J.-Y., Zhang J.-B., Bi L.-J., and Zhang X.-E. // *Journal of Applied Microbiology*. 2018. Vol. 124, no. 1. P. 286–293.
 38. Neijssel O. M., de Mattos M. J. T. The energetics of bacterial growth: a reassessment // *Molecular microbiology*. 1994. Vol. 13, no. 2. P. 179–182.
 39. Knowles C. J. Diversity of bacterial respiratory systems. CRC Press Boca Raton, FL, 1980.
 40. Quaranta M., Borisov S. M., Klimant I. Indicators for optical oxygen sensors // *Bioanalytical reviews*. 2012. Vol. 4. P. 115–157.
 41. Papkovsky D. B., Dmitriev R. I. Biological detection by optical oxygen sensing // *Chemical Society Reviews*. 2013. Vol. 42, no. 22. P. 8700–8732.
 42. Demas J. N., DeGraff B. A., Coleman P. B. Oxygen Sensors Based on Luminescence Quenching // *Analytical Chemistry*. 1999. Vol. 71. P. 793A–800A.
 43. Evaluation of the BACTEC™ MGIT™ 960 system for the recovery of mycobacteria / Kanchana M. V., Cheke D., Natyshak I., Connor B., Warner A., and Martin T. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000. Vol. 37, no. 1. P. 31–36.
 44. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* / Ardito F., Posteraro B., Sanguinetti M., Zanetti S., and Fadda G. // *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. Vol. 39, no. 12. P. 4440–4444.

45. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria / Cruciani M., Scarparo C., Malena M., Bosco O., Serpelloni G., and Mengoli C. // Journal of Clinical Microbiology. 2004. Vol. 42, no. 5. P. 2321–2325.
46. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system / Shin S. J., Han J. H., Manning E. J. B., and Collins M. T. // Journal of clinical microbiology. 2007. Vol. 45, no. 6. P. 1941–1948.
47. Ex vivo mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) for tuberculosis vaccine testing-a protocol for mouse splenocytes / Zelmer A., Tanner R., Stylianou E., Morris S., Izzo A., Williams A., Sharpe S., Pepponi I., Walker B., Hokey D. A., et al. // BioRxiv. 2015. P. 020560.
48. Hartmann P., Leiner M. J. P., Lippitsch M. E. Luminescence quenching behavior of an oxygen sensor based on a Ru (II) complex dissolved in polystyrene // Analytical Chemistry. 1995. Vol. 67, no. 1. P. 88–93.
49. Wang X.-d., Wolfbeis O. S. Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications // Chemical Society Reviews. 2014. Vol. 43, no. 10. P. 3666–3761.
50. Pesch K. L., Simmert H. Eine neue Resazurin-reduktionsprobe für Milchuntersuchung // Süddeutsche Molkerei Zeitung. 1928. Vol. 38. P. 1286.
51. The dairy industry: process, monitoring, standards, and quality / Burke N., Zacharski K. A., Southern M., Hogan P., Ryan M. P., and Adley C. C. // Descriptive Food Science / ed. by Diaz A. V., García-Gimeno R. M. Rijeka : IntechOpen, 2018. P. 33–45.
52. "Milk Testing and Payment Systems Resource Book: a practical guide to assist milk producer group". / Draaiyer J., Dugdill B., Bennett A., and Mounsey J. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. Access mode:

<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/bef9ea0c-ff51-4a8e-bea3-b2d218ca65f1/content>.

53. Pital A., Disque D. T., Leise J. M. A New Rapid Plate Method for determining Antibiotic Sensitivity // *Antibiotics & Chemotherapy*. 1956. Vol. 6. P. 351–359.
54. Pital A. A Rapid Method for Determining the Drug Susceptibility of *Mycobacterium Tuberculosis* // *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*. 1958. Vol. 78. P. 111–116.
55. Sorensen R. H. Rapid antibiotic sensitivity test using a redox indicator // *Medical Technicians Bulletin*. 1959. Vol. 10, no. 1. P. 144–150.
56. Rampersad S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays // *Sensors*. 2012. Vol. 12, no. 9. P. 12347–12360.
57. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and Resazurin / Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S., and Hübner H. // *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* / ed. by Gilbert D. F., Friedrich O. New York, NY : Humana Press, 2017. P. 1–17.
58. The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin / Candeias L. P., MacFarlane D. P. S., McWhinnie S. L. W., Maidwell N. L., Roeschlaub C. A., Sammes P. G., and Whittlesey R. // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. 1998. P. 2333–2334.
59. Chen J. L., Steele T. W. J., Stuckey D. C. Modeling and application of a rapid fluorescence-based assay for biotoxicity in anaerobic digestion // *Environmental Science & Technology*. 2015. Vol. 49, no. 22. P. 13463–13471.
60. Çakir S., Arslan E. Y. Voltammetry of resazurin at a mercury electrode // *Chemical Papers*. 2010. Vol. 64. P. 386–394.
61. Raman and fluorescence spectroelectrochemical monitoring of resazurin-resorufin fluorogenic system / Ibanez D., Izquierdo-Bote D., Perez-

- Junquera A., González-García M. Be., Hernandez-Santos D., and Fanjul-Bolado P. // *Dyes and Pigments*. 2020. Vol. 172. P. 107848.
62. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity / O'Brien J., Wilson I., Orton T., and Pognan F. // *European Journal of Biochemistry*. 2000. Vol. 267, no. 17. P. 5421–5426.
63. Abe T., Takahashi S., Fukuuchi Y. Reduction of Alamar Blue, a novel redox indicator, is dependent on both the glycolytic and oxidative metabolism of glucose in rat cultured neurons // *Neuroscience Letters*. 2002. Vol. 326, no. 3. P. 179–182.
64. A cost-effective, analytical method for measuring metabolic load of mitochondria / Grey J. F. E., Townley A. R., Everitt N. M., Campbell-Ritchie A., and Wheatley S. P. // *Metabolism Open*. 2019. Vol. 4. P. 100020.
65. Does the mass balance of the reactive tracers resazurin and resorufin close at the microbial scale? / Dallan E., Regier P., Marion A., and González-Pinzón R. // *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*. 2020. Vol. 125, no. 2. P. e2019JG005435.
66. Magnani E., Bettini E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect // *Brain Research Protocols*. 2000. Vol. 5, no. 3. P. 266–272.
67. Chen J. L., Steele T. W. J., Stuckey D. C. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays // *Biotechnology and Bioengineering*. 2018. Vol. 115, no. 2. P. 351–358.
68. Vieira-da Silva B., Castanho M. A. R. B. Resazurin reduction-based assays revisited: guidelines for accurate reporting of relative differences on metabolic status // *Molecules*. 2023. Vol. 28, no. 5. P. 2283.
69. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis* / Yajko D. M., Madej J. J., Lancaster M. V.,

- Sanders C. A., Cawthon V. L., Gee B., Babst A., and Hadley W. K. // Journal of Clinical Microbiology. 1995. Vol. 33. P. 2324–2327.
70. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / Palomino J.-C., Martin A., Camacho M., Guerra H., Swings J., and Portaels F. // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002. Vol. 46. P. 2720–2722.
71. Rapid identification and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: Standard operating procedure for non-commercial assays: Part 3: Colorimetric redox indicator assay v1. 3.12 / Singh S., Kumar P., Sharma S., Mumbowa F., Martin A., and Durier N. // Journal of Laboratory Physicians. 2012. Vol. 4. P. 120–126.
72. Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles: Potential, limitations and precautions / Chakansin C., Yostaworakul J., Warin C., Kulthong K., and Boonrungsiman S. // Analytical Biochemistry. 2022. Vol. 637. P. 114449.
73. Current and near-future technologies for antibiotic susceptibility testing and resistant bacteria detection / Dietvorst J., Vilaplana L., Uria N., Marco M.-P., and Muñoz-Berbel X. // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2020. Vol. 127. P. 115891.
74. Collins L. A., Franzblau S. G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* // Antimicrobial agents and chemotherapy. 1997. Vol. 41. P. 1004–1009.
75. Martin A., Portaels F., Palomino J. C. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007. Vol. 59. P. 175–183.
76. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and

- streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: updated meta-analysis / Coban A. Y., Deveci A., Sunter A. T., Palomino J. C., and Martin A. // International Journal of Mycobacteriology. 2014. Vol. 3. P. 230–241.
77. Perveen S., Sharma R. Screening approaches and therapeutic targets: The two driving wheels of tuberculosis drug discovery // Biochemical Pharmacology. 2022. P. 114906.
78. Emerging analytical techniques for rapid pathogen identification and susceptibility testing / Shin D. J., Andini N., Hsieh K., Yang S., and Wang T.-H. // Annual Review of Analytical Chemistry. 2019. Vol. 12. P. 41–67.
79. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems / van Belkum A., Burnham C.-A. D., Rossen J. W. A., Mallard F., Rochas O., and Dunne W. M. // Nature Reviews Microbiology. 2020. Vol. 18, no. 5. P. 1–13.
80. Haggerty R., Argerich A., Martí E. Development of a “smart” tracer for the assessment of microbiological activity and sediment-water interaction in natural waters: The resazurin-resorufin system // Water Resources Research. 2008. Vol. 44.
81. Knapp J. L. A., González-Pinzón R., Haggerty R. The resazurin-resorufin system: Insights from a decade of “smart” tracer development for hydrologic applications // Water Resources Research. 2018. Vol. 54. P. 6877–6889.
82. Increasing the scope of the resazurin-resorufin smart tracer system in hydrologic and biogeochemical sciences: The effects of storage duration and temperature on preservation / Howard B. C., Baker I., Kettridge N., Ullah S., and Krause S. // Limnology and Oceanography: Methods. 2022. Vol. 20. P. 701–709.
83. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening

- the Application Horizon / Lavogina D., Lust H., Tahk M.-J., Laasfeld T., Vellama H., Nasirova N., Vardja M., Eskla K.-L., Salumets A., Rincken A., and Jaal J. // *Biosensors*. 2022. Vol. 12. P. 196.
84. Liu S., Yin N., Faiola F. Prospects and Frontiers of Stem Cell Toxicology // *Stem Cells and Development*. 2017. Vol. 26. P. 1528–1539.
85. Multani P. K., Saini N. Stem cells in developmental toxicity testing // *Reproductive and Developmental Toxicology* / ed. by Gupta R. C. London–San Diego, CA–Cambridge, MA–Oxford : Academic Press, 2022.
86. Yusufu D., Mills A. Spectrophotometric and Digital Colour Colourimetric (DCC) analysis of colour-based indicators // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018. Vol. 273. P. 1187–1194.
87. de Santana P. C., Lourenco F. R. A smartphone-based bioassay for determining relative potency estimated from sigmoidal-response curves and respective measurement uncertainty // *Microchemical Journal*. 2020. Vol. 154. P. 104626.
88. Simple assessment of viability in 2D and 3D cell microarrays using single step digital imaging / Popova A. A., Reischl M., Kazenmaier D., Cui H., Amberger T., and Levkin P. A. // *SLAS Technology*. 2022. Vol. 27. P. 44–53.
89. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review / Fernandes G. M., Silva W. R., Barreto D. N., Lamarca R. S., Gomes P. C. F. L., da S Petrucci J. F., and Batista A. D. // *Analytica Chimica Acta*. 2020. Vol. 1135. P. 187–203.
90. Kim D.-M., Yoo S.-M. Colorimetric systems for the detection of bacterial contamination: Strategy and applications // *Biosensors*. 2022. Vol. 12, no. 7. P. 532.
91. Blood glucose determination with the reduction of resazurin as a fluorometric indicator reaction / Matsuura S., Yamauchi Y., Ohmori H., and Maeda H. // *Bunseki Kagaku*. 2002. Vol. 51, no. 2. P. 111–115.

92. DeBaun R. M., de Stevens G. On the mechanism of enzyme action. XLIV. Codetermination of resazurin and resorufin in enzymatic dehydrogenation experiments // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1951. Vol. 31, no. 2. P. 300–308.
93. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. Photophysics and photochemical reaction / Bueno C., Villegas M. L., Bertolotti S. G., Previtali C. M., Neumann M. G., and Encinas . M. V. // Photochemistry and Photobiology. 2002. Vol. 76, no. 4. P. 385–390.
94. Lee E., Chang J. W. Measurement of Concentration of Highly Concentrated Samples and Reaction Kinetics through Color Analysis // Applied Chemistry for Engineering. 2023. Vol. 34. P. 131–136.
95. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives / Schön T., Miotto P., Köser C. U., Viveiros M., Böttger E., and Cambau E. // Clinical Microbiology and Infection. 2017. Vol. 23. P. 154–160.
96. Munsell A. H. A color notation. Munsell Color Co., 1919. Access mode: <https://archive.org/details/colornotation00muns/mode/2up>.
97. Munsell A. H. Atlas of the Munsell color system. Mass. : Malden, 1915. Access mode: <https://archive.org/details/AtlasMunsellcol100Muns/mode/2up>.
98. Golding N. S., Jorgensen S. I. A Correlation of the Resazurin Grade with the Standard Plate Count of Raw Milk // Journal of Food Protection. 1945. Vol. 8. P. 189–195.
99. Takano T., Yoshihama F., Kako M. Relation between Direct Microscopic Method and Resazurin Test for Bacterial Count of Raw Milk // Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi). 1961. Vol. 2. P. 40–43.
100. Kissinger J. C. Modified resazurin test for estimating bacterial counts

- in maple sap: color standards // Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 1972. Vol. 55. P. 119–120.
101. Otsuka G., Nakae T. Resazurin test paper method for determining the sanitary quality of raw milk // Journal of Dairy Science. 1969. Vol. 52. P. 2041–2044.
 102. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates / Gabrielson J., Hart M., Jarelöv A., Kühn I., McKenzie D., and Möllby R. // Journal of Microbiological Methods. 2002. Vol. 50. P. 63–73.
 103. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays / Borra R. C., Lotufo M. A., Gagioti S. M., Barros F. d. M., and Andrade P. M. // Brazilian Oral Research. 2009. Vol. 23. P. 255–262.
 104. Spectrophotometric vs. colorimetric analysis of *Mycobacterium tuberculosis* population growth curves in resazurin assay / Postnikov E. B., Lavrova A. I., Khalin A. A., Dogonadze M. Z., and Manicheva O. A. // Proceedings of SPIE. 2019. Vol. 11067. P. 110670L.
 105. Lee E., Chang J. W. Evaluation of Concentration and Reaction Kinetics through Color Analyses // Applied Chemistry for Engineering. 2022. Vol. 33, no. 3. P. 279–283.
 106. Rapid assessment and prediction of microbiological quality of raw milk using machine learning based on RGB-colourimetric resazurin assay / Thanasirikul C., Patumvan A., Lipsky D., Bovonsombut S., Singjai P., Boonchieng E., and Chitov T. // International Dairy Journal. 2023. Vol. 146. P. 105750.
 107. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen / A.A. Zalata, N. Lammertijn, A. Christophe, and F.H. Comhaire // International journal of andrology. 1998. Vol. 21, no. 5. P. 289–294.
 108. AAT Bioquest. Absorption Spectrum Viewer. <https://www.>

- aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/resazurin(accessedon25April2023).
109. Photoreduction of resazurin in the presence of aliphatic amines / Neumann M. I. G., Schmitt C. C., Previtali C. M., and Bertolotti S. G. // *Dyes and pigments*. 1996. Vol. 32, no. 2. P. 93–99.
 110. AAT Bioquest. Absorption Spectrum Viewer. <https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/resorufin> (Accessed on 25.04.2023).
 111. Owen T. *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*. Santa Clara, CA : Agilent Technologies, 2000.
 112. Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay / Hu Y. Y., He S. S., Wang X., Duan Q. H., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., and Wang J. // *The American journal of pathology*. 2002. Vol. 160, no. 4. P. 1269–1278.
 113. Ali-Vehmas T., Louhi M., Sandholm M. Automation of the resazurin reduction test using fluorometry of microtitration trays // *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 1991. Vol. 38, no. 1-10. P. 358–372.
 114. Malacara D. *Color Vision and Colorimetry: Theory and Applications*. Bellingham, WA : SPIE Press, 2011. Access mode: <https://spie.org/Publications/Book/881172>.
 115. A framework for biosensors assisted by multiphoton effects and machine learning / Arano-Martinez J. A., Martínez-González C. L., Salazar M. I., and Torres-Torres C. // *Biosensors*. 2022. Vol. 12, no. 9. P. 710.
 116. Motulsky Harvey, Christopoulos Arthur. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*. Oxford University Press, 2004.
 117. Establishing Compliance between Spectral, Colourimetric and Photometric Indicators in Resazurin Reduction Test / Sychev A. V.,

- Lavrova A. I., Dogonadze M. Z., and Postnikov E. B. // Bioengineering. 2023. Vol. 10. P. 962.
118. Library of diversely substituted 2-(quinolin-4-yl) imidazolines delivers novel non-cytotoxic antitubercular leads / Krasavin M., Mujumdar P., Parchinsky V., Vinogradova T., Manicheva O., and Dogonadze M. // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2016. Vol. 31. P. 1146–1155.
119. Sternberg S. R. Biomedical image processing // Computer. 1983. Vol. 16, no. 01. P. 22–34.
120. A metabolic control analysis approach to introduce the study of systems in biochemistry: the glycolytic pathway in the red blood cell / Angelani C. R., Carabias P., Cruz K. M., Delfino J. M., de Sautu M., Espelt M. V., Ferreira-Gomes M. S., Gómez G. E., Mangialavori I. C., Manzi M., Pignataro M. F., Saffioti N. A., Salvatierra Frechou D. M., Santos J., and Schwarzbaum P. J. // Biochemistry and Molecular Biology Education. 2018. Vol. 46. P. 502–515.
121. Anon. Robust statistics: a method of coping with outliers. 2001.
122. Postnikov E. B., Lavrova A. I. Statistical features of REMA data of antimycobacterial drug screening and determining the minimal inhibitory concentration // 2021 6th International Conference on Intelligent Informatics and Biomedical Sciences (ICIIBMS) / IEEE. 2021. Vol. 6. P. 107–108.
123. Motulsky H.J., Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. GraphPad Software // Inc., San Diego, CA. 2003.
124. Колориметрический метод определения роста микобактерий и МИК с использованием нового портативного микробиологического анализатора / Сычев А. В., Лаврова А. И., Догонадзе М. З. and Постников Е. Б. // VII Съезд биофизиков России. Сборник научных трудов.

- В 2-х томах. Том. 2. Краснодар, 2023. Р. 210.
125. Sychev A. V., Lavrova A. I., Postnikov E. B. Quantitative colourimetry as an inexpensive alternative to spectrofluometry for drug response screening // TransMat 2K24: International Conference on Translational Materials for Sustainable Technology. Abstract Book. ИИТ (BHU) Varanasi, 2024. Р. 50.
126. Sychev A. V., Lavrova A. I., Postnikov E. B. Quantitative correspondence between drug-response curves in the REMA test measured fluorometrically and colourimetrically // IUPAB2024: Abstract Book. Kyoto, 2024.
127. Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догондзе М.З., Комарова К.Ю., Виноградова Л.В., Дарьин Д.В., Лаврова А.И., Постников Е.Б., Сычев А.В., Яблонский П.К. 8-(4-Метил-4Н-1,2,4-триазол-3-ил)-6-(метилсульфонил)-2-(5-нитро-2-фурил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан, обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения. // Заявка № 2023123064 на получение патента РФ от 04.09.2023.
128. Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догондзе М.З., Виноградова Л.В., Комарова К.Ю., Дарьин Д.В., Лаврова А.И., Постников Е.Б., Сычев А.В., Яблонский П.К. 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-циклогексил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фуоро[3,4-d]пиримидин], обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения // Заявка № 2023123605 на получение патента РФ от 11.09.2023.
129. Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догондзе М.З., Виноградова Л.В., Комарова К.Ю., Дарьин Д.В., Лаврова А.И., Постников Е.Б., Сычев А.В., Яблонский П.К.

- 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-пропил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фууро[3,4-d]пиримидин], обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения. // Заявка № 2023123605 на получение патента РФ от 20.11.2023.
130. Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догонадзе М.З., Виноградова Л.В., Комарова К.Ю., Дарьин Д.В., Лаврова А.И., Постников Е.Б., Сычев А.В., Яблонский П.К. 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-фенил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фууро[3,4-d]пиримидин], обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения. // Заявка № 2023130229 на получение патента РФ от 20.11.2023.
131. AlamarBlue® Assay. 2008. PI-DAL1025/1100Rev 1.0. Access mode: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TIAlamarBlueRev1.1.pdf.
132. Mouton J. W., Vinks A. A. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modelling of Antibacterials *In Vitro* and *In Vivo* Using Bacterial Growth and Kill Kinetics. The Minimum Inhibitory Concentration versus Stationary Concentration // *Clinical Pharmacokinetics*. 2005. Vol. 44. P. 201–210.
133. Small molecule interferences in resazurin and MTT-based metabolic assays in the absence of cells / Neufeld B. H., Tapia J. B., Lutzke A., and Reynolds M. M. // *Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 90, no. 11. P. 6867–6876.
134. Fukushima R. S., Weimer P. J., Kunz D. A. Photocatalytic interaction of resazurin N-oxide with cysteine optimizes preparation of anaerobic culture

- media // Anaerobe. 2002. Vol. 8. P. 29–34.
135. Baranyi J., Roberts T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food // International journal of food microbiology. 1994. Vol. 23, no. 3-4. P. 277–294.
136. Environmental and physiological factors affecting high-throughput measurements of bacterial growth / Atolia Esha, Cesar Spencer, Arjes Heidi A, Rajendram Manohary, Shi Handuo, Knapp Benjamin D, Khare Somya, Aranda-Díaz Andrés, Lenski Richard E, and Huang Kerwyn Casey // MBio. 2020. Vol. 11, no. 5. P. 10–1128.
137. Incorporating prior knowledge improves detection of differences in bacterial growth rate / Rickett L. M., Pullen N., Hartley M., Zipfel C., Kamoun S., Baranyi J., and Morris R. J. // BMC systems biology. 2015. Vol. 9. P. 1–12.
138. Giraud E., Lelong B., Raimbault M. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum* // Applied microbiology and biotechnology. 1991. Vol. 36. P. 96–99.
139. Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures / Silva Ana Paula Rosa da, Longhi Daniel Angelo, Dalcanton Francieli, and Aragão Gláucia Maria Falcão de // Brazilian archives of biology and technology. 2018. Vol. 61. P. e18160159.
140. Ensemble density-dependent synchronization of mycobacterial growth: BACTEC MGIT 960 fluorescence-based analysis and mathematical modelling of coupled biophysical and chemical processes / Lavrova A. I., Dogonadze M. Z., Sychev A. V., Manicheva O. A., and Postnikov E. B. // AIMS Microbiology. 2022. Vol. 8. P. 208.
141. Siddiqi S., Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960 TB system (also applicable for manual MGIT) // Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ. 2006.
142. Mycobacteriology Laboratory Manual, global laboratory initiative

- advancing TB diagnosis / Stinson K.W., Eisenach K., Kayes S., Matsumoto M., Siddiqi S., Nakashima S., et al. // Global Laboratory Initiative of Stop TB Partnership. 2014.
143. Synchronous replication initiation in novel *Mycobacterium tuberculosis* dnaA cold-sensitive mutants / Nair N., Dziedzic R., Greendyke R., Muniruzzaman S., Rajagopalan M., and Madiraju M. V. // Molecular Microbiology. 2009. Vol. 71, no. 2. P. 291–304.
144. Rubinow S. I. A maturity-time representation for cell populations // Biophysical Journal. 1968. Vol. 8, no. 10. P. 1055–1073.
145. Frenzen C. L., Murray J. D. A cell kinetics justification for Gompertz'equation // SIAM Journal on Applied Mathematics. 1986. Vol. 46. P. 614–629.
146. Revealing kinetics of chemical transitions in colorimetric indicators of microorganisms growth based on photometric data from a portable microbiological analyser / Sychev A. V., Belenkov R. N., Ukolov D. N., Budaev A. V., Lavrova A. I., and Postnikov E. B. // Proceedings of SPIE. 2022. Vol. 12194. P. 121940Z.
147. Sychev A. V., Postnikov E. B. On the relationship between the observed dynamics of a colorimetric indicator and the nonlinear dynamics of the population growth under study in the case of microbial cultures // Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy. Applied Nonlinear Dynamics. 2024. Vol. 32. P. 332–346.
148. Microbial population growth indication by coupled electro-optical and chemical dynamic systems / Sychev A. V., Belenkov R. N., Ukolov D. N., Budaev A. V., Lavrova A. I., and Postnikov E. B. // 13th International Conference Dynamical Systems Applied to Biology and Natural Sciences (DSABNS): Book of Abstracts. Basque Center for Applied Mathematics, Bilbao, 2022. P. 347–349.
149. Белењков Р.Н., Уколов Д.Н., Будаев А.В., Сычев А.В. Программа об-

работки результатов экспериментов, полученных с портативного микробиологического анализатора. // *Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2023619711, 15.05.2023.*