

На правах рукописи



Сычев Александр Владимирович

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

1.5.2 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2024

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Курский государственный университет».

Научный руководитель: **Постников Евгений Борисович**
д.ф.-м.н, доцент

Официальные оппоненты: **Чуев Геннадий Николаевич**
д.ф.-м.н., профессор, и.о. директора
ФГБУН ФИЦ «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН»

Семенов Константин Николаевич
д.х.н., доцент, заведующий кафедрой общей и биорганической химии, заведующий лабораторией биомедицинского материаловедения
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Ведущая организация: ФГБУН ФИЦ «Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН»

Защита состоится 20 марта 2025г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.06 при ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», расположенном по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 11, ауд. 515.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» и на официальном сайте ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по электронному адресу: <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-06/kandidatskaya-dissertaciya-sycheva-aleksandra>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Отзывы и замечания по автореферату в двух экземплярах, заверенные печатью, просьба высылать по вышеуказанному адресу на имя ученого секретаря диссертационного совета.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.ф.-м.н., профессор



Генина Элина Алексеевна

Общая характеристика работы

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 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 ря-

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.

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.

дом 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 зависимостью ⁵.

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

Для достижения поставленной цели определены и сформулированы *основные задачи* диссертационного исследования:

1. Установить соответствие между координатами цветковых 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

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.

- СИЕ $L^*a^*b^*$, 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 светопропускания 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.

Достоверность и соответствие паспорту специальности.

Достоверность полученных результатов, в части экспериментальных данных, обеспечивается их калибровкой с использованием стандартизированного специализированного оборудования; достоверность результатов обработки данных и следующих из них интерпретаций взаимосвязанных биофизических и физико-химических процессов обеспечивается применением стандартных численных методов, а также верификацией на основе сравнения с результатами альтернативных экспериментальных методов для ряда тестовых образцов.

Результаты соответствуют паспорту научной специальности 1.5.2. “Биофизика” (отрасль науки – физико-математические) по направлению исследований п. 1.4 “Биофизика сложных систем: медицинская биофизика” и п. 4 “Теоретическое и экспериментальное исследование физических процессов, протекающих в биологических системах разного уровня организации”.

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.

Содержание работы

Во Введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулированы цель и задачи исследования, аргументирована их научная новизна, показаны теоретическая и практическая значимости полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения и личный вклад автора.

В первой главе приведен обзор современного состояния исследований по теме диссертации, в частности, касающихся характерных особенностей роста культур микроорганизмов и биофизических предпосылок его регистрации на основе применения колориметрических и флуориметрических методов, выявлены проблемы их фундаментальной интерпретации получаемых данных и практического приложения данных методов в биофизических и биомедицинских исследованиях, требующие разработки; обозначены основные современные подходы к экспериментальному изучению жизнедеятельности популяций *M. tuberculosis*, включая отклик на антибактериальные препараты, и их ограничения, требующие дальнейших исследований.

Во второй главе диссертации представлены результаты исследований оптического отклика на процесс восстановления индикаторной среды – резазурина, необходимые для разработки и применения колориметрического анализа роста микробных популяций. Основные результаты этой главы заключаются в установлении соответствия между ростом концентрации резорурфина, образующегося в результате восстановления резазурина, и изменением цветовых параметров исследуемого раствора.

Для решения данной задачи сложный биохимический путь восстановления индикатора был смоделирован более простой 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.

Исследование изменений концентрации резазурина в ходе химического восстановления гидразином до резорурфина проводилось с помощью метода УФ-спектрофотометрии. Для получения кривых поглощения использовался спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Киото, Япония). При этом интервал интенсивности окраски раствора в процессе протекания реакции был согласован с соответствующим цветовым откликом, наблюдаемым в ходе стандартного протокола микробиологического теста REMA.

Зарегистрированные значения поглощения на длинах волн 599 нм (Y_{599}) и 570 нм (Y_{570}), соответствующих пикам поглощения чистого резазурина и резорурфина были пересчитаны в относительные концентрации данных веществ

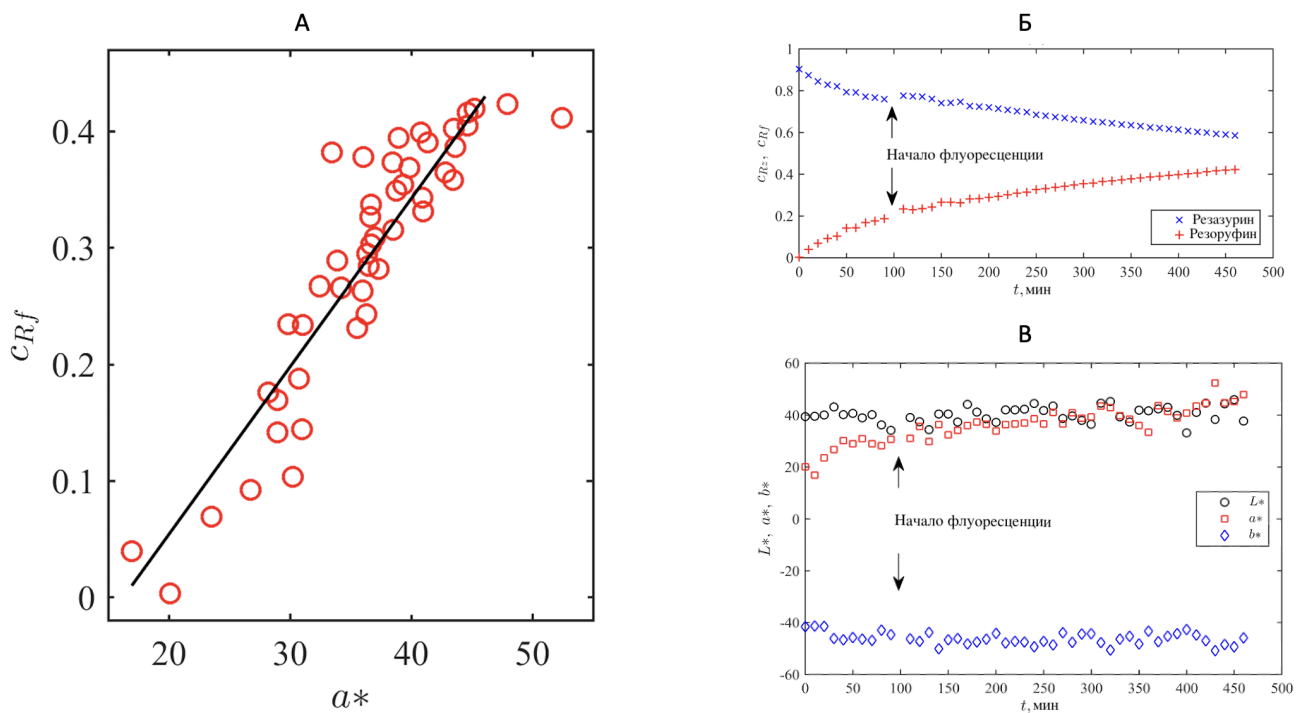


Рис. 1. (А) График корреляции между значениями цветового канала a^* и нормированной концентрацией резорурфина; (Б) временная динамика нормированных концентраций резазурина и резорурфина в ходе реакции первого с гидразином; (В) временная динамика медианных значений величин, соответствующих каналам цветового пространства СIE $L^*a^*b^*$, для изображений экспериментальной ячейки.

(c_{Rz} – концентрация резазурина; c_{Rf} – концентрация резорурфина) как

$$c_{Rz}(t) = \frac{10}{951} (100Y_{599}(t) - 7Y_{570}(t)), \quad (1)$$

$$c_{Rf}(t) = \frac{10}{951} (100Y_{570}(t) - 70Y_{599}(t)) \quad (2)$$

в силу того, что в спектре смеси на указанных выше длинах волн имеется вклад от обоих компонентов (веса вкладов известны из их стандартных спектров).

Рис. 1 (Б) показывает соответствующие нормированные кривые динамики концентрации субстрата и продукта целевой реакции; установлено, что после определенного переходного процесса реакция входит в требуемый для биофизических исследований режим (его начало детектируется по возникновению флуоресценции), описываемый химической реакцией первого порядка с сохранением полной нормированной концентрации реагентов ($c_{Rz} + c_{Rf} = 1$). Данный факт будет использован далее при экспериментальном анализе динамики микробиологической культуры на основе связанной химико-популяционной модели.

Следующим шагом было решение проблемы характеристики цветовых

данных, полученных в ходе эксперимента путем цифровой фотографии кюветы с реакционной смесью. Было отмечено, что представленные исходные многоканальные данные формата RGB являются нестационарными по всем каналам. Поэтому был использован альтернативный выбор цветового пространства – CIE $L^*a^*b^*$ (канал L^* – светлота, отделенная от тона и насыщенности; канал a^* определяет переход от зеленого и зелено-голубого до красно-малинового и красного цвета; канал b^* – переход из желтого в синий цвет). При этом каналы a^* напоминают цветовые изменения индикаторов резазурин-резорурфин. Все полученные фотографии кюветы с исследуемым раствором были преобразованы в цветовое пространство CIE $L^*a^*b^*$ стандартными функциями программного обеспечения ImageJ. Рис. 1 (В) показывает, что действительно, после выхода реакции в целевой режим наблюдается рост значения в цветовом канале a^* , в то время как значения цветовых каналов L^* и b^* стабильны с точностью до экспериментальных флуктуаций.

Следовательно, задача редуцируется к установлению соответствия между концентрацией одного из реагентов (в силу равенства $c_{Rz} + c_{Rf} = 1$) и одного количественного колориметрического индекса (a^*). Рис. 1 (А) показывает, что в диапазоне конверсии, характерном для диапазона используемого индикатора, определяемая по спектральной линии концентрация резорурфина c_{Rf} линейно коррелирует (коэффициент корреляции более 90%) со значениями интенсивности канала a^* цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$, которые были выделены из фотографий кюветы, содержащей реакционный раствор, в моменты времени измерения спектра.

Таким образом колориметрический анализ определяет "степень покраснения", непосредственно обусловленную присутствием резорурфина и предоставляет возможность непосредственной замены УФ-спектрофотометрии для нахождения концентрации производимого резорурфина количественным анализом цвета раствора.

В третьей главе рассматривается практическая задача определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) действия антибактериальных препаратов на культуру *M. tuberculosis* с применением двух колориметрических подходов, базирующихся на установленной закономерности взаимосвязи концентрации резорурфина, производство которого в условиях биофизического эксперимента связано с дыхательной активностью микроорганизмов, и значением интенсивности цветового канала a^* .

В рамках первого подхода используется портативный микробиологический анализатор (МПА), измеряющий интенсивность света, проходящего через каждую ячейку стандартного микробиологического планшета (рис. 2 (Б), слева). Конструкция данного прибора была модифицирована введением специального фильтра, используемого в освещении микробиологического планшета помещенного в ПМА.

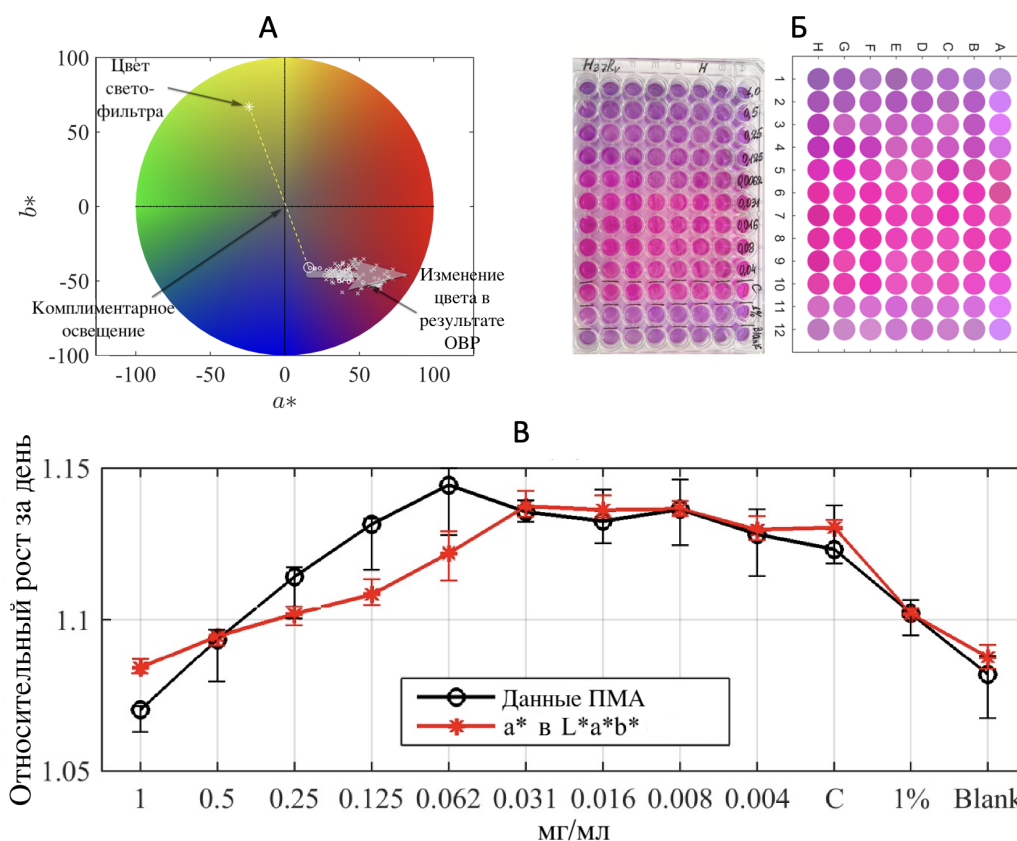
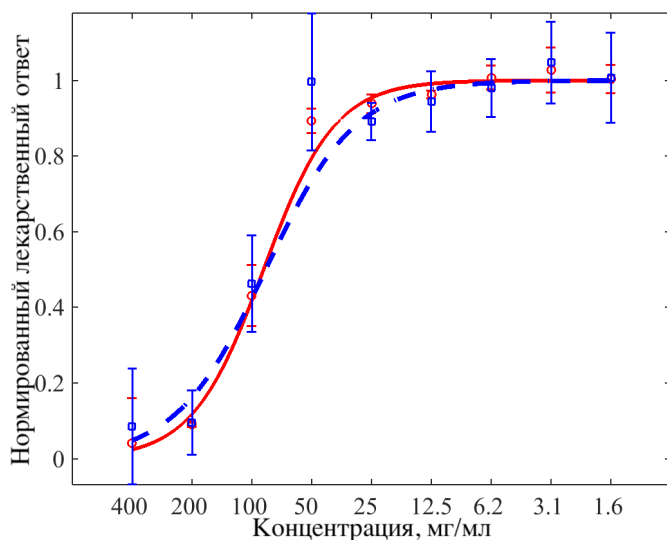


Рис. 2. (А) Цветовой круг схемы CIE $L^*a^*b^*$ с обозначенным положением фильтра портативного микробиологического анализатора и цветами раствора резазурина-резорурфина-гидразина в различные моменты времени; (Б) фотографическое изображение микробиологического планшета после окончания эксперимента по определению МИК и его цветовая реконструкция; (В) Кривые РЕМА-теста, полученные количественным колориметрическим (красные звездочки) и фотометрическим (черные кружки) методами .

Искомый фильтр был подобран таким образом, чтобы в цветовом пространстве CIE $L^*a^*b^*$ его цвет и цвет раствора исходного раствора резазурина были противоположны относительно нуля цветовой плоскости (a^* , b^*) (комплементарное освещение). Таким образом можно говорить о том, что процедура фильтрации настроена на обнаружение отклонений, возникающих при линейном сдвиге от этого исходного состояния, т.е. на фиксацию окраски резорурфина, образующегося в процессе жизнедеятельности культуры микроорганизмов, см. рис. 2 (А).

Тестовый эксперимент был проведен с культурой *M. tuberculosis*, стандартный лабораторный штамм H37Rv в жидкой среде Middlebrook 7H9. Рис. 2 (Б, слева) показывает фотографию микробиологического планшета на заключающей стадии эксперимента через 24 часа после внесения в ячейки планшета антимикобактериального препарата изониазида согласно процедуре определения МИК.

Фотографии планшета были обработаны с помощью программного обес-



Функция Ротбарда, задающая нормированную кривую “доза–отклик” (обобщенная кинетика Хилла степени β_4)

$$NDR(c) = \frac{1}{1 + \left(\frac{c}{\beta_3}\right)^{\beta_4}}$$

с логарифмическим параметром чувствительности β_3 .

Рис. 3. Нормированные кривые “доза–отклик” при воздействии на штамм H37Rv *M. tuberculosis* [Krasavin et al, 2016] для 1-4-[2-(хинолин-4-ил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]пирими-ди-2-илпиперидин-4-ил)метанол: красные кружки и кривая получены с помощью флуориметра и их регрессии [Postnikov & Lavtova, 2022], синие квадратики и кривая получены новым разработанным методом по фото того же планшета из значений интенсивности канала a^* , полученных с помощью колориметрического анализа.

печения ImageJ с применением коррекции освещенности и последующего считывания и усреднения цветовой информации в лунках планшета с применением плагина "ReadPlate 3.0". Обработанное распределение цветового отклика на концентрацию действующего лекарственного вещества показано на рис. 2 (Б, справа). Результаты для цветовой информации преобразовывались в цветовое пространство CIE $L^*a^*b^*$ дальнейшим использованием данных по каналу a^* .

Оба набора данных (фотометрические и колориметрические, согласованные с концентрационными) были подвергнуты статистической обработке. На рис. 2 (В) представлено сравнение полученных зависимостей, характеризующих отклик микобактериальной популяции на изониазид в стандартной форме теста РЕМА. Оба эксперимента демонстрируют зависимость отклика микобактериальной культуры на концентрацию действующего вещества как функцию последней при ее высоких значениях, а также существование пороговой концентрации изониазида, ниже которой угнетающего действия изониазида не наблюдается. Это пороговое значение подтверждает МИК, равную 0.031 мкг/мл, известную действием на стандартный лекарственно-восприимчивый штамм *M. tuberculosis* H37Rv.

Практическим применением разработанного метода определения МИК является анализ предоставленных СПб НИИФ результатов резазуринового теста для четырех новосинтезированных соединений (химические названия

даны в заголовках публикаций [6–9]), с целью установления их антимикробактериальной активности в случае лабораторного штамма *M. tuberculosis* и H37Rv четырех штаммов (396у, 4542, 6691 и 7074), отличающихся лекарственной устойчивостью к стандартным препаратам. Были построены кривые “доза-ответ”, с помощью которых, были определены количественные значения МИК действующих веществ. Надежность метода и результатов верифицирована с использованием сравнения результатов колориметрического анализа с анализом, выполненным ранее на основе показаний планшетного флуориметра FLUOstar Optima (BMG Labtech, Оффенбург, Германия), для ранее исследованных веществ со сходным типом активности, см. рис. 3.

Четвертая глава посвящена экспериментам, связанным с определением динамики роста микрокультур. В качестве тестовой культуры выбраны (*Lactobacillus plantarum* 8P-A3 и *Lactobacillus fermentum* 90T-C4) с добавлением компонентов защитной среды (желатин, сахароза, молоко) (АО НПО «Микроген», Москва, Россия), что обусловлено наличием известных данных по динамике популяционного роста лактобактерий на основе прямого метода подсчета КОЭ, т.е. они могут служить хорошо обоснованной референтной группой, позволяющей разграничить популяционный и химический вклады в динамику, регистрируемую оптическими методами.

Главной задачей на данном этапе является решение проблемы, связанной с сопоставлением временной зависимости изменения концентрации индикатора с ростом микробиологической культуры, т.к. изменение первого может говорить не только о росте культуры, но и о ее жизнеспособности в условиях стационарной численности, а также ограничиваться наличием доступного количества индикатора в растворе.

При рассматриваемом ограничении реакцией перехода резазурина в резорурфин, соответствующей кинетике первого порядка, колориметрически регистрируемая концентрация резорурфина в общем случае является нетривиальной функцией времени в зависимости от временной эволюции численности микроорганизмов $N(t)$ и имеет вид

$$y(t) = x_0 \left[1 - \exp \left(-k \int_0^t N(t) dt \right) \right], \quad (3)$$

где x_0 – начальная концентрация резазурина, k – кинетическая константа соответствующей реакции индикатора. Следует отметить, что решение (3) зависит от времени даже в том случае, когда популяция является постоянной по численности, но жизнеспособной, т.е. $N = N_s = \text{const}$ и концентрация регистрируемого резорурфина растёт, экспоненциально приближаясь к стационару. Кроме того, выход на стационар кривой роста цветового может быть

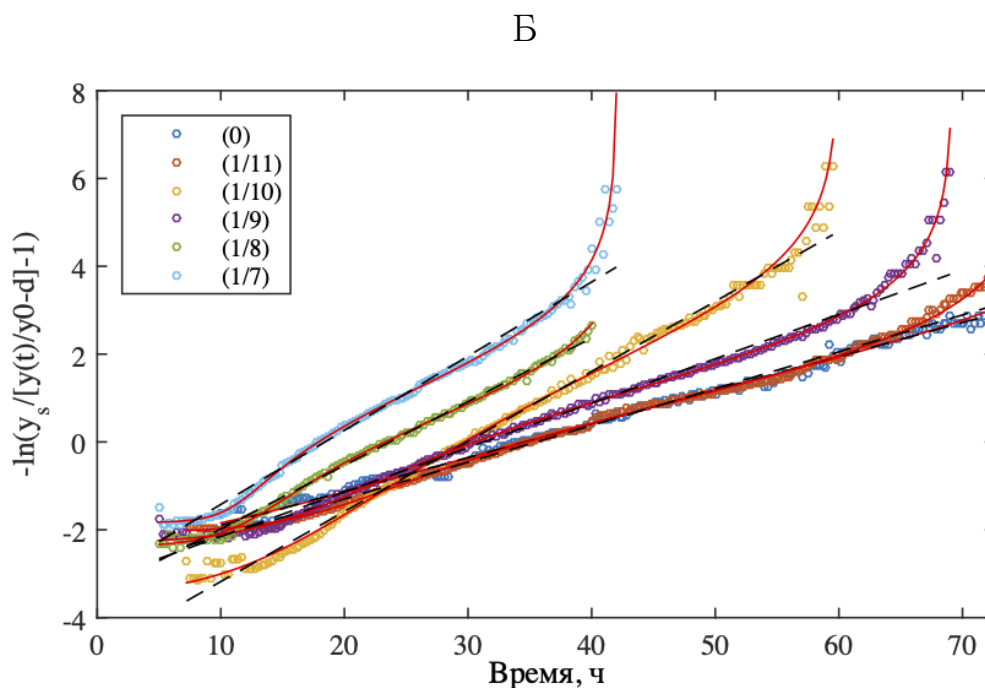
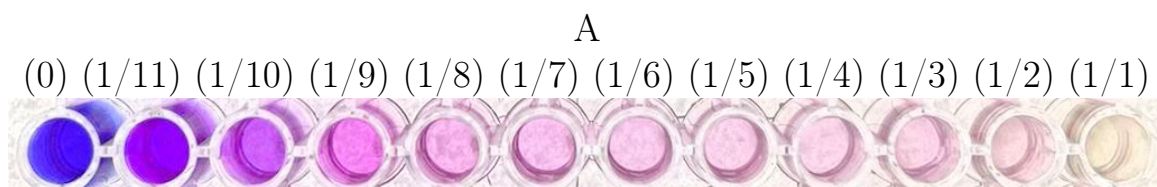


Рис. 4. (А) Фотография лунок микробиологического планшета, сделанная через 72 часа после начала эксперимента. (Б) Экспериментальные данные (точки) и их соответствие комбинированной популяционно-химической модели (сплошная линия); прерывистая линия соответствует решению уравнения Ферхюльста

связан с переходом резазурина в следующий реагент – бесцветный дигидро-резорурфин. Для получения фотометрических кривых был использован ПМА, непрерывно записывающий данные с временным интервалом 15 мин между измерениями. Рис. 4 (А) показывает пример полного варианта колориметрических реакций (над каждой из лунок подписано относительное начальное разведение в долях от $4 \cdot 10^8$ КОЕ; обозначение (0) соответствует резазуриновому контролю без добавления культуры). В рамках модели, ограниченной необратимым переходом резазурина в резорурфин, варианты кинетики быстрого обесцвечивания в связи с восстановлением резорурфина до гидрорезорурфина (разведения более чем (1/7)) детально не анализировались.

Экспериментальные данные представлены на Рис. 4 (Б) маркерами, при этом использовано координатное представление, в котором рост, соответствующий стандартному уравнению Ферхюльста, должен давать прямую линию

$$-\ln \left(\frac{K-d}{y/y_0-d} - 1 \right) = r't_m - r't, \quad (4)$$

где сдвиг получившейся прямой $r't_m$ определяется начальными условиями, а наклон r' задает скорость роста, соответствующую логистическому уравнению, t_m – момент времени, соответствующий половинному росту. Принимая во внимания то, что показания прибора отражают изменение количества продукта химической реакции y , применена нормировка $y(0)/y_0 = 1$ и, учитывая то, что отсутствие резорфуфина в системе представляет собой его нулевую концентрацию, регрессия данных решением уравнения Ферхюльста осуществляется со сдвигом на константу d , определяемую начальной концентрацией.

Из рис. 4 (Б) видно, что представление данных логистической функцией является существенно приближенным и выполняется только на ограниченном участке времени. При этом сплошные линии, отвечающие за оба процесса — популяционного роста и химической реакции индикатора — и полученные интегрированием уравнения (3) аккуратно проходят по существенно нелинейной кривой расположения экспериментальных данных.

При этом следует отметить, что полная популяционно-биохимическая модель приводит к зависимости скорости популяционного роста от условий эксперимента. Обсуждается выявленный контрольный параметр kK/r , зависящий от истинной скорости популяционного роста r , скорости биохимической реакции, катализируемой процессами в дыхательной цепи бактерий k и емкостью среды K , а также биофизические процессы приводящие к его вариабельности.

Другой задачей, рассмотренной в данной главе, является исследование особенностей роста стандартного штамма *M. tuberculosis* H37Rv в условиях существенного колониеобразования, приводящего к немонотонности роста кривой индикаторного отклика. Исходно данный факт был отмечен при регистрации кривых флуоресценции с помощью системы ВАСТЕС MGIT 960 с временным разрешением 1 ч (рис. 5 А). Для подтверждения того, что данный эффект не является инструментальным, а отражает биофизическую динамику, был проведен альтернативный эксперимент с использованием ПМА и лучшего временного разрешения (15 мин), результаты которого представлены на рис. 5 Б. Оба эксперимента демонстрируют согласованную картину скачкообразных явлений, наблюдаемых на кривых роста, которые начинаются через некоторое переходное время и продолжаются практически до последней стадии роста перед насыщением.

Временные интервалы между последовательными субинтервалам достаточно стабильны и равны 15 ч. Из этого можно сделать вывод, что такое поведение обуславливается синхронизацией культурального роста и деления синхронизовавшихся колоний. Данное заключение обсуждается также в сопоставлении с различными данными, относящимися к физиологии и молекулярной биологии микобактериального роста, а также биофизики колониеобразования. Проведена регрессия экспериментальных данных решениями урав-

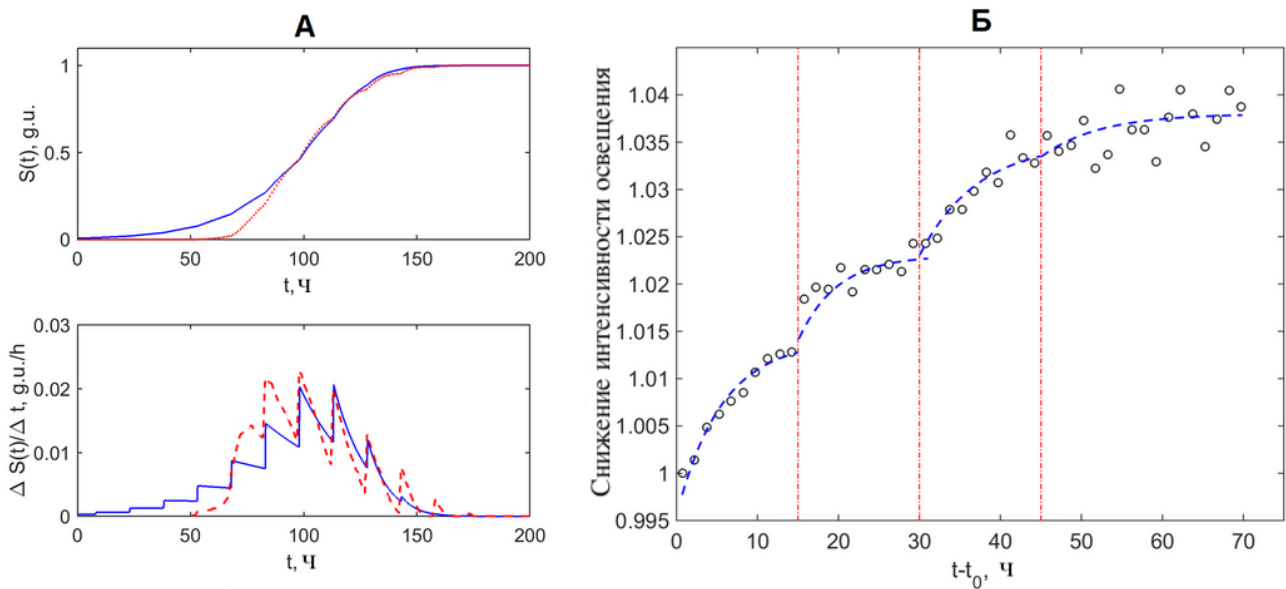


Рис. 5. (А) Временная зависимость нормированной интенсивности флуоресценции метода ВАСТЕС, отражающей рост культуры *M. tuberculosis* (верхняя панель, красная кривая), расчетная кривая на основе модели связанной популяционно-химической модели (синяя кривая) и производная наблюдаемой кривой роста (нижняя панель, цветовая кодировка аналогична верхней панели); (Б) фотометрическая кривая, отражающая рост *M. tuberculosis* в лунке микробиологического планшета как реакцию изменения цвета (маркеры) и ее регрессия последовательностью функций ограниченного роста.

нения модели стохастического роста с синхронизацией, мера которой убывает с течением времени из-за вариабельности длины клеточного цикла, дополненной химической моделью вида (3). Выявлено согласие как с ходом наблюдаемых кривых и их производных, а также подтверждено заключение о важности величины затравочной концентрации микобактерий (продемонстрировано, что разбавление культуры приводит к монотонности кривой роста индикатора).

В Заключении приведены основные выводы по результатам работы в целом:

1. В условиях, соответствующих стандартному протоколу микробиологического исследования роста жизнеспособной микробной среды REMA, интервал изменения цвета резазурин-резорурфиновой смеси отвечает линейной зависимости между концентрацией резорурфина, 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 ко-

лориметрической 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК как изданиях,

индексируемых Scopus и Web of Science

1. Сычев А.В., Постников Е.Б. О взаимосвязи наблюдаемой динамики колориметрического индикатора с нелинейной динамикой исследуемого популяционного роста в случае микробиологических культур // *Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика*. 2024. Т. 32. С. 332-346.
2. Sychev A.V., Lavrova A.I., Dogonadze M.Z., Postnikov E.B. Establishing compliance between spectral, colourimetric and photometric indicators in Resazurin reduction test. *Bioengineering*. 2023. V. 10:962.
3. Lavrova A.I., Dogonadze M.Z., Sychev A.V., Manicheva O.A., Postnikov E.B. Ensemble density-dependent synchronization of mycobacterial growth: BACTEC MGIT 960 fluorescence-based analysis and mathematical modelling of coupled biophysical and chemical processes. *AIMS Microbiology*. 2022. V. 8:208.
4. *Статья в трудах конференции, проиндексированная Scopus*
Sychev A.V., Belenkov R.N., Ukolov D.N., Budaev A.V., Lavrova A.I., Postnikov E.B. Revealing kinetics of chemical transitions in colorimetric indicators of microorganisms growth based on photometric data from a portable microbiological analyser. *Proceedings of SPIE*. 2022. V. 12194: 121940Z.
5. *Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ*
Беленьков Р.Н., Уколов Д.Н., Будаев А.В., Сычев А.В. Программа обработки результатов экспериментов, полученных с портативного микробиологического анализатора. // *Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2023619711*, 15.05.2023.
6. *Патенты на изобретения*
Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догонадзе 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. *Патент РФ № RU 2 825 646*, дата регистрации 28.08.2024
7. 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'-циклогексил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фуро[3,4-d]пиримидин], обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения. *Патент РФ RU 2 825 647*, дата регистрации 28.08.2024

8. 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'-пропил-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. *Патент РФ № RU 2 824 817, дата регистрации 14.08.2024.*
 9. 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'-фуоро[3,4-d]пиримидин], обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения. *Патент РФ No RU 2 824 815, дата регистрации 14.08.2024.*
- Прочие публикации*
10. 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. P. 835.
 11. 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*. ИТ (BHU) Varanasi, 2024. P. 50.
 12. Sychev A.V., Lavrova A., Dogonadze M., Postnikov E. Interplay Between Coupled Chemical, Biochemical, and Colorimetric Processes as a Basis for Fast Drug Activity Screening with a Portable Analyzer // *AIMECS 2023. 14th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Abstract Book..* Seoul, 2023. P.180–181.
 13. Сычев А.В., Лаврова А.И., Догонадзе М.З., Постников Е.Б. Колориметрический метод определения роста микобактерий и МИК с использованием нового портативного микробиологического анализатора // *VII Съезд биофизиков России. Сборник научных трудов. В 2-х томах. Том. 2.* Краснодар, 2023. С. 210.
 14. Sychev A.V., Belenkov R.N., Ukolov D.N., Budaev A.V., Lavrova A.I., Postnikov E.B. Microbial population growth indication by coupled electro-optical and chemical dynamic systems // *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.

Научное издание

Сычев Александр Владимирович

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук на тему:

Количественный анализ характеристик бактериального роста на основе
колориметрических данных

Подписано в печать: . Формат 60 × 90 1/16. Тираж 100 экз. Заказ .

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии Курского государственного
университета 305000, г. Курск, ул. Золотая, 8.