

УДК 579.61:616-092

Лектины *Pseudomonas aeruginosa* как мишени для новых антибактериальных соединений

А. В. Гришин^{1,2*}, М. С. Кривоzubов¹, А. С. Карягина^{1,2,3}, А. Л. Гинцбург¹¹ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18²ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: grishin-a1@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.09.2014

После доработки 27.02.2015

РЕФЕРАТ Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* – один из наиболее распространенных и проблемных оппортунистических патогенов, способный колонизировать различные органы и ткани человека и зачастую обладающий устойчивостью ко многим применяемым в клинической практике антибиотикам. Эта устойчивость может быть связана с появлением специфических генов устойчивости, с присущей данному патогену способностью противостоять попаданию антибиотиков внутрь клетки, а также образовывать биопленки. В связи с этим в настоящий момент активно исследуется возможность создания соединений, отличающихся по механизму действия от обычных антибиотиков (подавляющих рост микроорганизмов или вызывающих их гибель), направленных на снижение способности патогена колонизировать и повреждать человеческие ткани за счет ингибирования факторов вирулентности и подавления образования биопленок. Среди наиболее изученных белков *P. aeruginosa* – мишеней для подобного рода соединений – можно выделить лектины LecA и LecB, связывающие остатки галактозы и фукозы и олиго- и полисахариды, содержащие эти остатки. В представленном обзоре суммированы результаты экспериментов, свидетельствующих о важности этих белков для патогенности *P. aeruginosa*, приведены данные об ингибиторах лектинов и их эффективности в различных экспериментальных моделях. Особое внимание уделено ингибированию лектинов LecA и LecB в экспериментальных моделях инфекции на лабораторных животных и в клинической практике. Приведенная информация свидетельствует о том, что ингибирование лектинов можно рассматривать как перспективное направление борьбы с синегнойной палочкой. Однако, несмотря на наличие ингибиторов, чрезвычайно эффективных *in vitro*, для перехода к стадии доклинических исследований требуются дальнейшие эксперименты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биопленки, ингибиторы, лектин, резистентность, синегнойная палочка, устойчивость, *Pseudomonas aeruginosa*, LecA, LecB.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактозид; PQS – *Pseudomonas* quinolone signal, хинолоновый сигнал псевдомонад; IFN-γ – интерферон-γ; Le^a, Le^x – антигены системы групп крови Льюиса; TNFα – tumor necrosis factor α, фактор некроза опухолей α; ITC – isothermal titration calorimetry, изотермическая титрационная калориметрия; ELLA – enzyme-linked lectin assay, лектин-ферментный анализ; SPR – surface plasmon resonance, поверхностный плазмонный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* – широко распространенная бактерия, способная вести как сапротрофный, так и паразитический образ жизни. Синегнойная палочка может колонизировать практически любые ткани человека, благодаря чему вызывает множество разнообразных острых и хронических заболеваний. В их число входят острая

пневмония, бактериемия, инфекции мочевыводящих путей, наружный отит, дерматит, раневой и ожоговый сепсис, кератит, менингит, абсцесс головного мозга, эндокардит, различные инфекции костей и суставов. *P. aeruginosa* – оппортунистический патоген, который поражает, в первую очередь, людей с ослабленным иммунитетом, будучи одним из наиболее проблемных госпитальных патогенов. По со-

временным данным не менее 10–15% всех внутрибольничных инфекций вызвано *P. aeruginosa* [1, 2]. Кроме того, *P. aeruginosa* часто колонизирует легкие больных муковисцидозом – наследственным заболеванием, связанным с дефектом хлоридных каналов и накоплением вязкого секрета в легких, что приводит к снижению функции легких и продолжительности жизни больного [2].

Одна из основных проблем, связанных с терапией инфекций *P. aeruginosa*, – невосприимчивость этого патогена ко многим антимикробным препаратам. Устойчивость синегнойной палочки к антибиотикам складывается из нескольких аспектов. Во-первых, при необходимости патоген регулирует количество поринов и, следовательно, проницаемость мембраны для антибиотиков, а также экспрессирует большое количество белков, активно выводящих молекулы антибиотиков из клетки. Во-вторых, *P. aeruginosa*, как и многие другие патогены, легко приобретает гены специфической устойчивости к различным антибиотикам, например, гены β-лактамаз и ферментов, инактивирующих аминогликозиды [2]. Наконец хронические инфекции *P. aeruginosa* сопровождаются образованием биопленок. Биопленки представляют собой организованные сообщества микроорганизмов, погруженных во внеклеточный полимерный матрикс, который состоит из синтезированных этими же микроорганизмами полисахаридов, белков и ДНК [3, 4]. В составе биопленок бактерии становятся значительно более устойчивыми к неблагоприятным условиям среды, а также к антимикробным агентам и факторам иммунной системы человека [3]. При этом синегнойная палочка образует трудно устранимые биопленки не только в органах и тканях больных, но также на имплантируемых устройствах и катетерах [3, 5]. Один из популярных подходов, направленных на исправление этой ситуации, предполагает разработку соединений, не убивающих патогенные бактерии за счет подавления биосинтеза, но ингибирующих или инактивирующих их факторы вирулентности: токсины, адгезины, эффекторные белки, модулирующие метаболизм и иммунный ответ организма-хозяина, и системы секреции, доставляющие эти белки к месту действия, а также факторы, способствующие коммуникации бактерий друг с другом и образованию ими биопленок [6]. Иначе говоря, стратегия заключается в том, чтобы «не убить, а разоружить» патоген. Предполагается, что устойчивость к таким антивирулентным соединениям будет вырабатываться медленнее, поскольку они не будут влиять непосредственно на жизнеспособность бактерий, но будут действовать только на их способность инфицировать человека.

В качестве одной из мишеней для подобных антивирулентных соединений рассматриваются лектины *P. aeruginosa* LecA и LecB – растворимые белки, связывающие остатки галактозы (LecA) и фукозы (LecB) как отдельно, так и в составе олиго- и полисахаридов. Считается, что эти белки участвуют в прикреплении патогена к клеткам человека, вызывают повреждение эпителиальных тканей, а также играют значительную роль в образовании биопленок *P. aeruginosa*, действуя, таким образом, как важные факторы вирулентности. В настоящем обзоре мы постарались суммировать результаты исследований, раскрывающих роль лектинов LecA и LecB в патогенезе и формировании биопленок, описать ингибиторы этих белков, известные на настоящий момент, а также оценить перспективы использования этих белков в качестве мишеней для терапии инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

ЛЕКТИНЫ *P. aeruginosa*: ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Лектины LecA и LecB (также часто встречаются названия PA-II и PA-III) были выделены из *P. aeruginosa* в 1970-х годах как белки, способные вызывать агглютинацию эритроцитов человека и различных животных [7–9]. Оба лектина представляют собой небольшие белки размером 121 (LecA) и 115 (LecB) аминокислотных остатков (12.8 и 11.9 кДа соответственно) [10, 11]. LecA связывает *D*-галактозу, а также, с меньшей аффинностью, *N*-ацетил-*D*-галактозамин. Наибольшим сродством к LecB обладает *L*-фукоза, но он связывает также маннозу и некоторые другие сахара. Несмотря на отсутствие какого-либо сходства аминокислотных последовательностей, четвертичная организация LecA и LecB сходна: оба лектина образуют гомотетрамерные комплексы, где каждый из мономеров имеет свой сайт связывания лигандов. Таким образом, один тетрамер способен связывать четыре молекулы соответствующего углевода [12, 13] (рис. 1). Среди бактерий рода *Pseudomonas* гены *lecA* и *lecB* уникальны для *P. aeruginosa*, однако их гомологи встречаются у некоторых других бактерий, таких, как *Burkholderia* и *Photobacterium*.

Регуляция синтеза лектинов, в первую очередь LecA, изучена достаточно подробно. Синтез обоих лектинов индуцируется при достижении культурой бактерий стационарной фазы роста и регулируется *rhl* и хинолоновым сигналом (PQS), компонентами системы «quorum sensing» [14, 15]. Работа этой системы основана на выделении бактериями в среду низкомолекулярных соединений различной природы (в частности, ацилгомосеринлактонов и хинолонов), позволяющих сигнализировать другим бактериям того же вида о своем присутствии. Таким образом бактерии «чувствуют», когда их популяция достига-

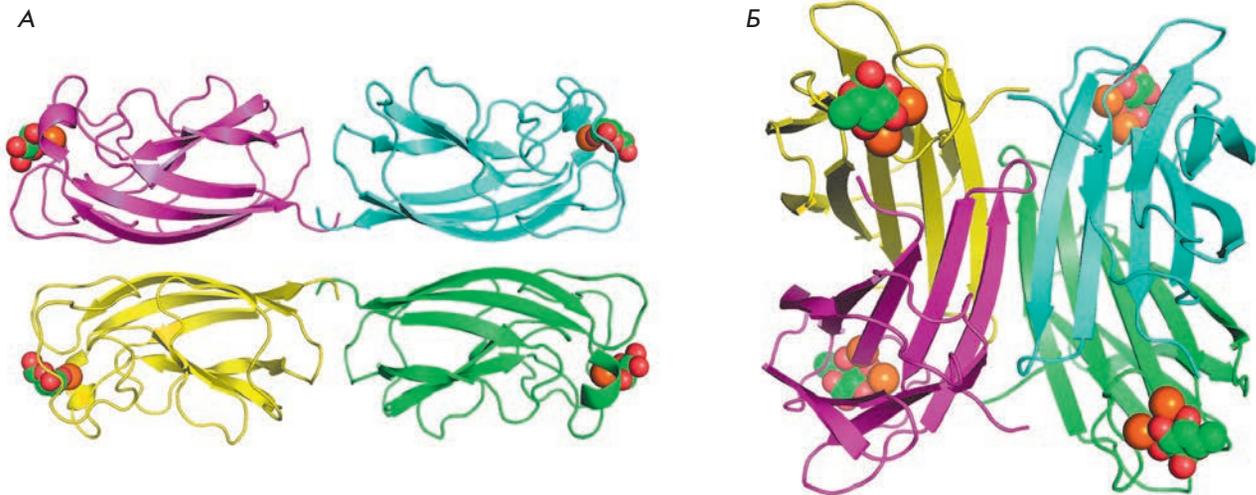


Рис. 1. Общий вид тетрамеров LecA (А) и LecB (Б). Отдельные мономеры показаны разными цветами в виде схематического изображения полипептидной цепи, в которой плоскими стрелками выделены β -тяжи в соответствующей ориентации. Оранжевыми сферами показаны ионы кальция, связанные галактоза и фукоза показаны зелеными (атомы углерода) и красными (атомы кислорода) сферами

ет определенной плотности, и запускают экспрессию факторов вирулентности, таких, как протеазы LasA и LasB, экзотоксин А, щелочная протеаза и др., а также процесс образования биопленки [16]. Характер регуляции экспрессии LecA более всего совпадает с регуляцией синтеза пиоцианина – важного токсина, способствующего развитию окислительного стресса и связанных с ним повреждений клеток организма-хозяина [14, 15, 17–20]. Интересно, что количество продуцируемого LecA, как и других факторов вирулентности, увеличивается при контакте патогена с некоторыми молекулами организма-хозяина, сигнализирующими о его стрессовом состоянии, такими, как норадреналин, IFN- γ , аденозин и κ -опиоидный пептид динорфин [19, 21–23].

В клетке лектины *P. aeruginosa* локализуются, в первую очередь, в цитоплазме, а также в некотором количестве на поверхности наружной мембраны [24, 25]. LecB на наружной мембране, вероятнее всего, связывается с остатками фукозы гликолипидов или гликопротеинов [25, 26]. Например, показано, что LecB взаимодействует с одним из основных поринов наружной мембраны *P. aeruginosa* OprF и не обнаруживается на мембране бактерий, мутантных по гену *oprF* [26]. Впрочем, учитывая, что мутации в гене *oprF* приводят к значительному изменению свойств наружной мембраны *P. aeruginosa* в целом [27], не исключено, что в закреплении LecB на мембране могут участвовать и другие белки. Локализация LecA, в отличие от LecB, практически не изучена.

РОЛЬ ЛЕКТИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ

Роль лектинов LecA и LecB в патогенезе заболеваний, сопровождающихся инфекцией *P. aeruginosa*, в настоящий момент не определена однозначно. Существуют данные, свидетельствующие о том, что эти лектины способствуют адгезии бактерий к субстрату, например, клеткам человека, участвуют в агрегации бактериальных клеток и образовании биопленок, а также во взаимодействии бактерии с тканями организма-хозяина, приводящем к повреждению тканей. Предполагаемая роль лектинов схематично суммирована на *рис. 2*.

Адгезия

Лектины LecA и LecB связывают олигосахариды многих гликопротеинов человека и других млекопитающих [28–34], что естественным образом приводит к предположению о непосредственном участии лектинов в адгезии *P. aeruginosa* к тканям человека [35]. Адгезия является важным этапом патогенеза, именно с адгезии бактериальных клеток на поверхности эпителиальной ткани начинается колонизация, что затем может привести к образованию биопленки или инвазии патогена. Однако экспериментальные данные о роли лектинов LecA и LecB в адгезии *P. aeruginosa* противоречивы. Вентворт и соавт. [36] изучали прикрепление бактерий к культуре клеток эпителия роговицы кролика. Было показано, что добавление лизата бактериальных клеток способствует увеличению количества прикрепившихся интактных бактерий, и этот эффект частично подавляется до-

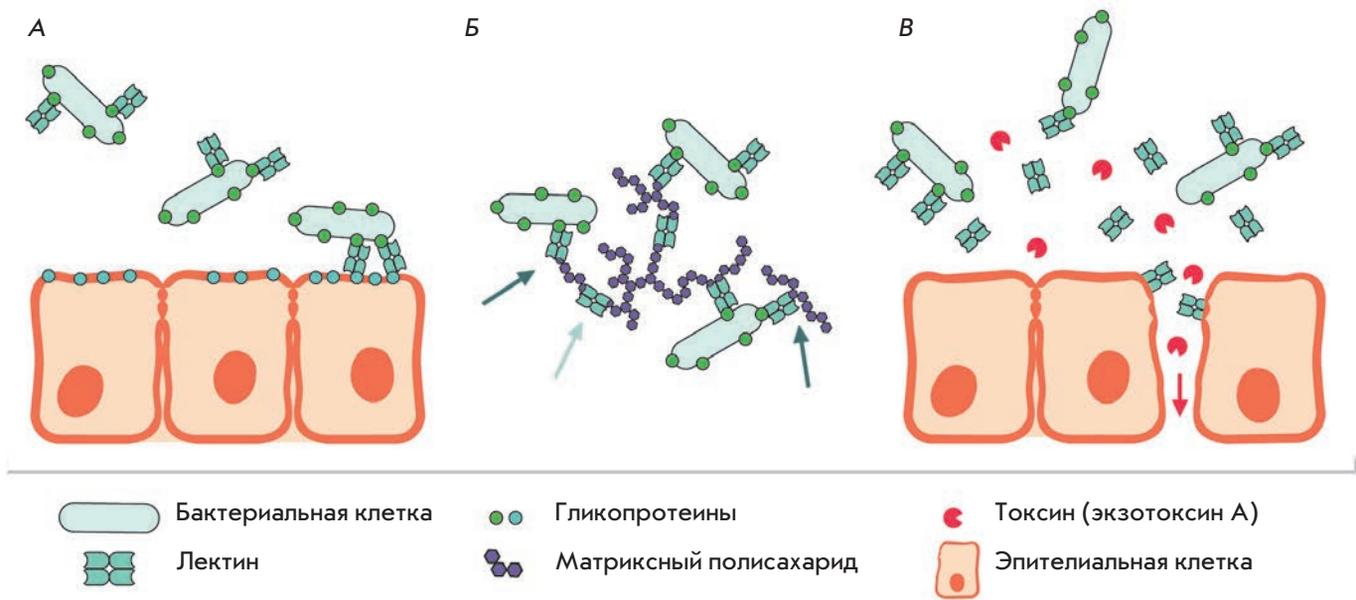


Рис. 2. Предполагаемые функции лектинов *P. aeruginosa*: адгезия к эпителиальным клеткам организма-хозяина (А); прикрепление бактериальных клеток к полисахаридам матрикса биопленок и «сшивание» цепочек полисахаридов друг с другом (Б); нарушение барьерной функции и повышение проницаемости эпителиального слоя для других факторов патогенности (В). Светло-серой стрелкой отмечен пример сшивания полисахаридов лектином, темно-серыми стрелками – прикрепление полисахарида к гликопротеинам бактериальной клетки, красной стрелкой обозначено проникновение токсинов через эпителий

бавлением галактозы, маннозы и фукозы. Сделан вывод, что стимуляция адгезии связана с высвобождением лектинов, находившихся в цитоплазме лизированных бактериальных клеток. Прикрепление бактерий к фибронектину – одному из наиболее распространенных гликопротеинов человека, также подавлялось при добавлении сахаров, в первую очередь сиаловой кислоты, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина, в меньшей степени – галактозы и фукозы [37]. Однако, в отличие от предыдущей работы, добавление LecA не повышало, а наоборот, снижало количество прикрепившихся к иммобилизованному фибронектину бактериальных клеток. Штаммы *P. aeruginosa*, мутантные по генам *lecA* и *lecB*, сохраняют свою способность связываться с муцинами – гликопротеинами, секретруемыми эпителиальными клетками [38], но значительно хуже прикрепляются к клеткам линии A549 эпителия дыхательных путей человека [39, 40]. Также было показано, что прикрепление к клеткам A549 дозозависимо подавляется лигандами лектинов метил-β-галактозидом и метил-α-фукозидом [40], а прикрепление к immortalized клеткам легочного эпителия линий NuLi (здорового человека) и CuFi (больного муковисцидозом) – добавлением антител к LecB, но не контрольных неспецифических анти-

тел [41]. При этом в работе Айерхоффа и соавт. [42], напротив, показано, что взаимодействие лектина LecA с глоботриаозилцерамидом (Gb3) необходимо для проникновения *P. aeruginosa* внутрь клеток легочного эпителия человека линии H1299, а также внутрь искусственных везикул, но не играет роли в адгезии. Бактерии, мутантные по гену *lecA*, прикрепляются к клеткам H1299 и искусственным везикулам так же, как и бактерии дикого типа. Эти противоречия, вероятно, объясняются разными субстратами, которые используются при изучении адгезии (изолированные гликопротеины, эпителиальные клетки различного происхождения), и то, будут ли лектины влиять на прикрепление к конкретному субстрату, зависит от спектра имеющихся на его поверхности олигосахаридов.

Необходимо также отметить, что, помимо лектинов, адгезия *P. aeruginosa* к клеткам организма-хозяина обеспечивается и другими факторами, такими, как флагеллы и пили типа IV [43, 44], и отделить эффекты, связанные с наличием разных адгезинов, достаточно проблематично. Кроме того, известно, что функциональный LecB необходим для нормальной сборки пилей *P. aeruginosa* и секреции некоторых белков [38]. Таким образом, хотя лектины *P. aeruginosa* важны для прикрепления патогена к некоторым

типам клеток человека, конкретный механизм этого процесса остается не до конца понятным, его важность для инфекции *in vivo* – неопределенной, а роль лектинов в нем может быть как прямой (взаимодействие с гликановыми структурами на поверхности клеток), так и косвенной (участие в сборке, секреции и функционировании других адгезинов, таких, как пили типа IV).

Биопленки

Оба лектина участвуют не только в адгезии, но и в образовании биопленок *P. aeruginosa*. Независимыми группами исследователей на разных экспериментальных моделях было показано, что штаммы *P. aeruginosa*, мутантные по генам *lecA* и *lecB*, формируют менее развитые биопленки, лишенные выраженной архитектуры, присущей биопленкам штаммов дикого типа [25, 38, 45, 46]. Кроме того, при выращивании биопленок *P. aeruginosa* на стальных пластинках добавление изопропил-β-D-тиогаалактозида (ИПТГ) или нитрофенилгалактозида (производных галактозы, способных связываться с LecA с более высокой аффинностью, чем галактоза) подавляло образование биопленок до уровня *lecA*-мутанта (площадь поверхности биопленки уменьшалась в 2 раза по сравнению с биопленками дикого типа в отсутствие ИПТГ), а добавление галактозидов к уже сформированным биопленкам приводило к их разрушению. При этом галактозиды не влияли на формирование и разрушение биопленок штаммом, мутантным по *lecA* [45]. Аналогичным образом биопленки, образованные на предметных стеклах *P. aeruginosa*, мутантным по *lecB*, были значительно тоньше и меньше по площади, чем биопленки дикого типа [25, 46]. Как и галактозиды, лиганд LecB нитрофенилфукозид препятствовал образованию биопленок и частично разрушал биопленки дикого типа, но не *lecB*-мутанта. Интересно, что нитрофенилфукозид подавлял образование биопленок не только лабораторным штаммом PAO1, но и тремя клиническими изолятами [46].

К сожалению, хотя эти работы и указывают на необходимость функциональных генов лектинов для образования полноценных биопленок, непосредственная функция лектинов в этом процессе остается не выясненной. Возможно, роль лектинов заключается в агрегации бактериальных клеток и формировании микроколоний. По крайней мере, Диггл и соавт. не наблюдали формирования микроколоний *lecA*-мутантом [45]. Лектин LecB необходим для правильной сборки пилей типа IV, которые, в свою очередь, требуются для образования биопленок [38]. Возможно, лектины способствуют прикреплению полисахаридов внеклеточного матрикса биопленок к бактериальным клеткам или необхо-

димы для сшивки отдельных цепочек этих полисахаридов между собой. Такая сшивка полисахаридных цепей с помощью мультивалентных лектинов могла бы способствовать образованию более плотных и устойчивых к физическим воздействиям биопленок. Интересно, что в состав внеклеточного полисахарида Psl, абсолютно необходимого для образования биопленок *P. aeruginosa*, входит манноза и, по некоторым данным, галактоза – лиганды лектинов LecB и LecA соответственно [47, 48]. Прикрепление этого полисахарида к бактериальным клеткам необходимо для инициации процесса образования биопленки [49].

Влияние на эпителиальные клетки

В нескольких работах изучено непосредственное влияние лектинов на эпителиальные клетки дыхательных путей и кишечника человека. Так показано, что добавление LecA существенно замедляет рост эпителиальных клеток носовых полипов, а также способствует снижению количества клеток, несущих реснички. Кроме того, LecA вызывал образование в клетках крупных вакуолей, а при больших концентрациях – отслаивание клеток [50]. Показано также значительное снижение частоты биения ресничек мерцательного эпителия при инкубации с LecA [51, 52]. Влияние LecA на частоту биения ресничек устранялось добавлением D-галактозы. Наблюдали блокирование биения ресничек при добавлении LecB, и этот эффект снимался добавлением фукозы [51–54]. В норме движение ресничек эпителия дыхательных путей способствует удалению из легких слизи и задержанных ею чужеродных частиц, в том числе бактериальных клеток. Вероятнее всего, ингибирование функции ресничек вызвано связыванием лектинов с гликопротеинами на поверхности эпителиальных клеток и ответом эпителиальных клеток на это событие либо непосредственно за счет «склеивания» отдельных ресничек друг с другом [51]. Описанные эффекты, однако, показаны только в моделях *in vitro*, а то, насколько они важны при инфекции дыхательных путей *in vivo*, остается не ясным.

Лектин LecA также оказывает негативное влияние на эпителий кишечника. В частности, добавление LecA к культурам клеток Caco-2 и T-84 значительно снижает трансэпителиальное электрическое сопротивление клеточного монослоя, а также повышает проницаемость монослоя для маннита, причем N-ацетилгалактозамин аттенюирует этот эффект [21, 55, 56]. Вероятнее всего, это связано с нарушением лектином плотных межклеточных контактов [55]. Повышение проницаемости кишечного эпителия наблюдали *in vivo* на мышинной модели кишечной инфекции [21, 55, 56]. При инъекции LecA вместе с эк-

зотоксином А или эластазой в слепую кишку мышей, перенесших гепатэктомию 30% печени, смертность достигала 100% через 48 ч, чего не было при инъекции только ЛесА, экзотоксина А или эластазы. Аналогично, к 100% смертности приводила инъекция клинического изолята *P. aeruginosa*, но не мутанта, лишенного способности экспрессировать ЛесА. Учитывая, что внутривенная инъекция экзотоксина А смертельна для мышей, вероятнее всего, инъекция ЛесА в слепую кишку обеспечивает проницаемость эпителия для экзотоксина А, который за счет этого попадает в кровотоки.

ЛИГАНДЫ И ИНГИБИТОРЫ ЛЕКТИНОВ

Свои функции лектины выполняют за счет связывания олиго- и полисахаридов, будь то олигосахариды гликопротеинов человека или бактерий или матричные полисахариды биопленок *P. aeruginosa*. Определяющую роль в этом процессе играет специфичность лектинов по отношению к связываемым сахарам.

Лектин ЛесА предпочтительно связывается с α -D-галактозой и олиго- и полисахаридами, содержащими концевые невосстанавливающие остатки α -D-галактозы, такими, как антигены групп крови В, Р^k и Р₁, мелибиоза и галактобиоза, растительные галак-

томаннаны и др. [28–30, 57]. Как и у многих других лектинов, в сайте связывания галактозы ЛесА находится ион кальция, фиксированный координационными связями с карбоксильными группами белка. Молекула галактозы располагается в сайте связывания в своей наиболее стабильной ⁴C₁-конформации, при этом атомы О3 и О4 участвуют в координационных связях с фиксированным ионом кальция, атомы О2, О3 и О4 образуют дополнительные водородные связи с аминокислотными остатками белка, а атом О6 – с молекулой воды, прочно удерживаемой в сайте двумя водородными связями [12, 58] (рис. 3А). Константа диссоциации комплекса ЛесА с галактозой равна 88 мкМ [59]. В связывании лектином ЛесА олигосахаридов основную роль играет именно концевой остаток α -D-галактозы, тогда как другие остатки олигосахаридов образуют достаточно малочисленные контакты с белком [31, 58]. В связи с этим в зависимости от состава олигосахаридов и деталей гликозидной связи, соединяющей концевой остаток галактозы со следующим остатком в олигосахариде, аффинность олигосахаридов к ЛесА хотя и может отличаться, но в достаточно узких пределах: константы диссоциации, как правило, составляют от 30 до 130 мкМ [31, 58]. Помимо α -D-галактозы, ЛесА может связывать N-ацетил-D-галактозамин, хотя и с меньшей аффин-

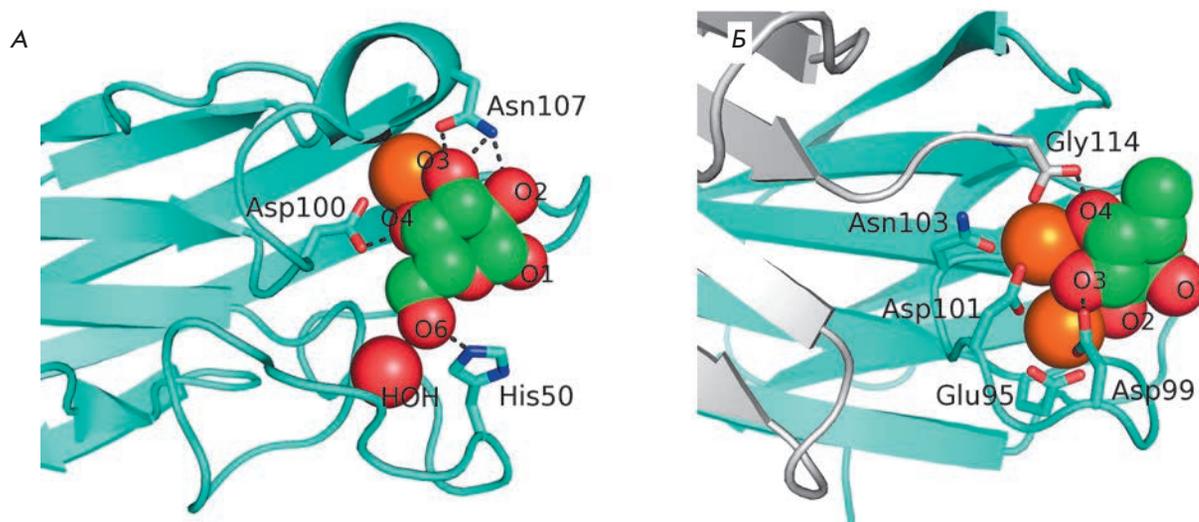


Рис. 3. Детальное изображение сайтов связывания сахаров ЛесА (А) и ЛесВ (Б). Лектины показаны в виде схематического изображения полипептидной цепи, в которой плоскими стрелками выделены β -тяжи в соответствующей ориентации. Ионы кальция показаны оранжевыми сферами, связанные галактоза и фукоза – зелеными (атомы углерода) и красными (атомы кислорода) сферами. Молекула воды, участвующая в связывании галактозы ЛесА, показана в виде сферы красного цвета, некоторые аминокислотные остатки, участвующие в связывании сахаров или координации ионов кальция, показаны в виде скелетной модели; черными пунктирными линиями показаны водородные связи атомов сахара с боковыми цепями аминокислотных остатков лектинов. Серым цветом (Б) показан еще один мономер ЛесВ, С-концевой глицин (Gly114) которого участвует в формировании сайта связывания соседнего мономера

ностью [7, 60], а также аденин и ацилгомосеринлактоны, однако, это взаимодействие реализуется с помощью независимого сайта связывания [61, 62].

ЛесВ обладает более широкой специфичностью и большей аффинностью к своим лигандам. Он способен связывать *L*-фукозу и *L*-фукозиламин, *L*-галактозу, *D*-арабинозу, *D*-маннозу и *D*-фруктозу [63–65]. Константа диссоциации комплекса ЛесВ с *L*-фукозой равна 2.9 мкМ, взаимодействие с другими сахарами несколько слабее [65]. Столь высокая для лектина аффинность объясняется тем, что в сайте связывания лигандов ЛесВ находятся сразу два фиксированных иона кальция, координационные взаимодействия с которыми определяют связывание сахаров с ЛесВ (рис. 3). Оптимальное расположение гидроксильных групп сахара для координации двух ионов кальция ЛесВ соответствует двум гидроксилам в экваториальном и одному в аксиальном положении. Это вносит решающий вклад в специфичность ЛесВ – все связываемые ЛесВ сахара имеют указанное расположение гидроксильных групп в своих наиболее энергетически выгодных конформациях [63, 65]. Как и ЛесА, ЛесВ взаимодействует с олигосахаридами, имеющими концевые невосстанавливающие остатки соответствующих моносахаридов, в частности *L*-фукозы. Так, показано, что ЛесВ способен связывать олигосахариды групп крови А, В и Н, а также Le^a и Le^x [28, 32, 66, 67]. Основной вклад в энергию взаимодействия олигосахаридов с ЛесВ вносит концевой остаток фукозы, хотя за счет состава и расположения других остатков моносахаридов аффинности олигосахарида можно повысить в 14 раз по сравнению с фукозой, что показано для Le^a [32].

За последнее десятилетие предложено множество различных ингибиторов как ЛесА, так и ЛесВ. За исключением пептидов-гликомиметиков [52] все они так или иначе содержат в своем составе остатки соответствующих сахаров в качестве аффинных групп. К таким ингибиторам относятся производные моносахаридов, мультивалентные гликокластеры и дендримеры различной химической природы, а также природные гликопротеины и полисахариды.

Одновалентные производные моносахаридов

Многие производные моносахаридов связываются с лектинами *P. aeruginosa* с большей аффинностью, чем исходные сахара. Например, даже небольшие гидрофобные заместители по первому атому кислорода увеличивают сродство соответствующих сахаров как к ЛесА, так и к ЛесВ. Так, константа диссоциации комплекса ЛесА с ИПТГ почти в 3 раза меньше, чем с *D*-галактозой [59, 60], а комплекса ЛесВ с метил- α -*L*-фукозидом в 7 раз меньше, чем с немодифицированной *L*-фукозой [65].

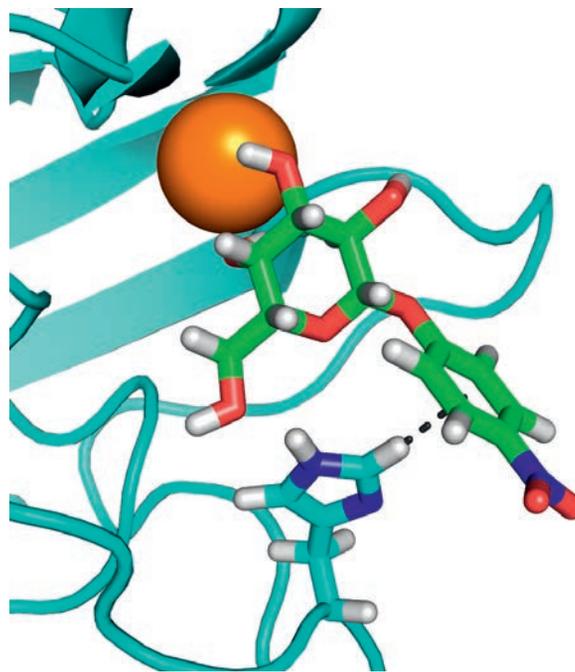


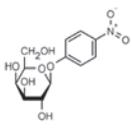
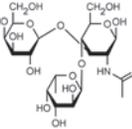
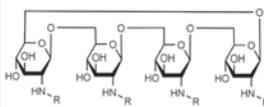
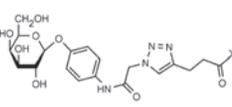
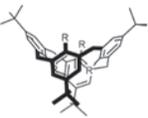
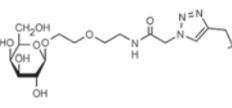
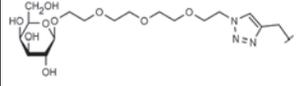
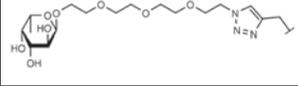
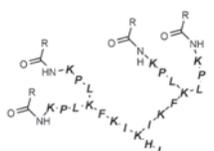
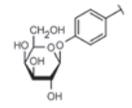
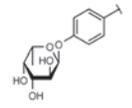
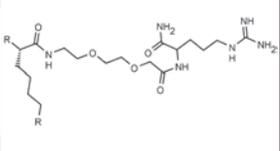
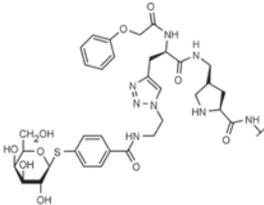
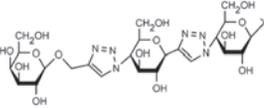
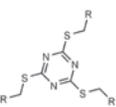
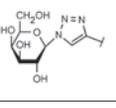
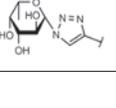
Рис. 4. Комплекс нитрофенилгалактозида с ЛесА. Нитрофенилгалактозид и боковая цепь остатка His50 ЛесА показаны скелетной моделью, черной пунктирной линией показано СН- π -взаимодействие

Еще большего повышения сродства галактозидов к ЛесА можно добиться за счет введения простых ароматических заместителей. У таких соединений, как фенилгалактозид, *n*-нитрофенилгалактозид (таблица, соединение 1), *n*-аминофенилгалактозид, *n*-толилгалактозид, нафтилгалактозид и др., K_d с ЛесА составляет 4–15 мкМ (напомним, K_d незамещенной *D*-галактозы равна почти 90 мкМ) [68]. Это связано с образованием π -системой ароматического кольца контакта с атомом водорода на ϵ -углероде гистидина 50 ЛесА (рис. 4). Такой тип взаимодействия называется СН- π -взаимодействием, его энергия составляет примерно 1 ккал/моль. Для сравнения, энергия взаимодействия ЛесА с *D*-галактозой равна 6.0 ккал/моль. По механизму такое взаимодействие сходно с водородной связью, однако в качестве акцептора водорода выступает не электроотрицательный атом с неподеленной электронной парой, а ароматическая система π -электронов [68]. Введение алифатических заместителей либо ароматических заместителей, отделенных от галактозы алифатическим линкером, препятствующим образованию СН- π -взаимодействия, дает значительно меньший прирост аффинности [68–71].

В случае лектина ЛесВ подобной простой закономерности не обнаружено. Среди одновалентных

ОБЗОРЫ

Некоторые наиболее эффективные ингибиторы лектинов *P. aeruginosa*

Номер	Химическая формула матрицы (для мультивалентных соединений)	Химическая формула функциональной группы	Лектин-мишень, ссылка	Валентность	Аффинность (ITC: K_d ; ELLA: IC ₅₀)	Улучшение аффинности по сравнению с моносахаридом (в скобках – в пересчете на один моносахарид)
1			LecA, [59]	1	ITC: 14.1 мкМ	ITC: 6 (6)
2			LecB, [32]	1	ELLA: 0.51 мкМ; ITC: 0.2 мкМ	ELLA: 12 (12) ITC: 14 (14)
3			LecA, [71]	4	ELLA: 57 нМ; ITC: 79 нМ	ELLA: 1210 (300) ITC: 1114 (278)
4			LecA, [70]	4	ELLA: 7 мкМ; SPR: 1.0 мкМ; ITC: 90 нМ	ELLA: 50 (12) SPR: 58 (14) ITC: 978 (244)
5			LecA, [40,80]	4	SPR: 500 нМ ITC: 176 нМ	SPR: 143 (35) ITC: 500 (125)
6			LecB, [40]	4	ITC: 48 нМ	ITC: 60 (15)
7			LecA, [59]	4	ITC: 0.1 мкМ	ITC: 880 (220)
8			LecB, [46]	4	ELLA: 0.14 мкМ	ELLA: 79 (20)
9			LecA, [91]	2	ITC: 82 нМ	ITC: 1073 (537)
10			LecA, [89]	2	Ингибирование связывания FITC-LecA, IC ₅₀ : 2.7 нМ; ITC: 28 нМ	Ингибирование связывания FITC-LecA: 7407 (3703) ITC: 3143 (1572)
11			LecA, [79]	3	ITC: 1.1 мкМ	ITC: 80 (27)
12			LecB, [79]	3	ITC: 50 мкМ	ITC: 0.6 (0.2)

лигандов наибольшим сродством к LecB обладает олигосахарид Le^a (таблица, соединение 2) [32]. K_d комплекса LecB с Le^a составляет 210 нМ, в то время как у комплекса с *L*-фукозой – 2.9 мкМ. Хотя было предпринято несколько попыток разработать более аффинные, чем Le^a, лиганды, эта цель так и не была достигнута. Так, различные производные дисахарида α -*L*-Fuc-(1→4)- β -*D*-GlcNAc – составной части Le^a – обладали таким же сродством к LecB, как и сам Le^a. Анализ кристаллической структуры комплекса показал, что введенные заместители просто не участвуют в образовании каких-либо контактов с белком [72]. Была создана серия фукозиламидов, где первый атом кислорода фукозы заменен на атом азота амидной группы, несущей различные достаточно большие заместители несахарной природы [73]. Все соединения связывались с LecB с константами диссоциации 0.68–2.1 мкМ, что не дает какого-либо улучшения по сравнению с Le^a и даже метилфукозидом. Это объясняется неспособностью амидной группы взаимодействовать с консервативной молекулой воды, участвующей в связывании лигандов лектином LecB. Наконец Хауком и соавт. [74] создано несколько классов производных метил-*D*-маннозида – другого сахара, связывающегося с LecB с меньшей, чем фукоза, аффинностью ($K_d = 71$ мкМ). Некоторые амидные и сульфонамидные производные по шестому положению маннозы показали значительный прирост аффинности. Так, K_d для одного из сульфонамидов была равна 3.3 мкМ. Хотя это более чем в 20 раз лучше по сравнению с исходным метилманнозидом, никакого улучшения по сравнению с фукозой и, тем более Le^a, добиться не удалось.

Таким образом, на данный момент не существует одновалентных лигандов, более чем на один порядок превосходящих немодифицированные моносахариды по своему сродству к лектинам. Отчасти в связи с этим многие исследователи сосредоточили свое внимание на создании мультивалентных ингибиторов.

Мультивалентные соединения

Как правило, лектины, независимо от растительного, животного или бактериального происхождения, связывают сахара с достаточно низкой аффинностью [75]. Преодолеть это ограничение позволяет мультивалентность как самих лектинов, так и их лигандов. Под мультивалентностью подразумевается наличие в одной молекуле или молекулярном комплексе нескольких одинаковых сайтов связывания. Например, лектины могут быть организованы в гомомультимерные белковые комплексы, а гликопротеины – рецепторы лектинов, могут нести несколько одинаковых гликановых цепей, связываемых лектинами.

Подобная мультивалентность позволяет добиться значительного повышения аффинности и специфичности взаимодействия лектинов с гликанами за счет нескольких механизмов. Во-первых, в некоторых случаях несколько сайтов мультивалентного лектина могут связывать несколько эпитопов мультивалентного лиганда одновременно. Подобное взаимодействие называют хелатирующим, или «bridging». Во-вторых, даже при невозможности одновременного связывания наличие нескольких эпитопов, способных взаимодействовать с лектином, на одной молекуле-лиганде повышает локальную концентрацию этих эпитопов. При диссоциации комплекса лектина с одним эпитопом лектин имеет большую вероятность связаться с другим аналогичным эпитопом, расположенным рядом. Такой механизм «перехватывания» лиганда называется в англоязычной литературе «statistical rebinding» [76, 77]. В последнее время эти эффекты все чаще используются при создании мультивалентных соединений, ингибирующих действие лектинов – гликокластеров, гликодендримеров и гликополимеров [76, 78].

Лектины *P. aeruginosa* не стали исключением. Для обоих лектинов этого патогена, особенно для LecA, создано большое количество соединений, относящихся к разным химическим классам, с разной валентностью, различными линкерами между сахаром и основой мультивалентного соединения. В качестве мультивалентных ингибиторов LecA были предложены гликокластеры на основе тритиоциануровой кислоты [79], каликсаренов и резорцинаренов [40, 70, 80–82], линейных и циклических β -пептоидов, порфирина [81], фуллеренов [83] и циклоолигосахаридов [71], функционализированные остатками галактозы полифенилацетиленовые полимеры [84] и золотые наночастицы [85], дендримеры пептидной [59, 86] и непептидной природы [87, 88] и двухвалентные соединения [89–91]. В качестве ингибиторов LecB – синтетические олигомеры на основе пентаэритритилфосфодиэфиров [92], дендримеры на основе лизинов и циклопептидов [93], на основе *D*- и *L*-олигопептидов [46, 94, 95], гликокластеры на основе тритиоциануровой кислоты [79] и каликсаренов [40], а также двух- и трехвалентные соединения, функционализированные не фукозой, а дисахаридом α -*L*-Fuc-(1→4)- β -*D*-GlcNAc [96].

У многих из этих соединений значительно увеличено сродство к соответствующему лектину (в опытах по ИТС, Isothermal Titration Calorimetry) и эффективность в подавлении связывания лектина с иммобилизованными сахарами (в ELLA, Enzyme-Linked Lectin Assay). Так, галактозилированные гликокластеры на основе циклических олигосахаридов (таблица, соединение 3) [71] и каликсаренов (табли-

ца, соединение 4) [70], олигопептидный дендример (таблица, соединение 7) [59], а также двухвалентный лиганд, отобранный в ходе скрининга библиотеки из 625 соединений (таблица, соединение 9) [91] имели K_d с LecA порядка 80–100 нМ, что почти в 1000 раз меньше K_d галактозы. Наибольшим же сродством к LecA на настоящий момент обладает двухвалентный лиганд, в котором два остатка галактозы соединены жестким линкером длиной порядка 24 Å, его K_d равна 28 нМ (таблица, соединение 10) [90]. Согласно результатам молекулярного моделирования, все эти лиганды способны связывать два мономера одного тетрамера LecA, обеспечивая хелатирующий эффект, которым, вероятно, объясняется столь значительное увеличение аффинности. При этом у тетрамера LecB сайты связывания фукозы соседних мономеров находятся гораздо дальше друг от друга (~26–28 Å у LecA и не менее 35–37 Å у LecB), и увеличение сродства за счет мультивалентности у ингибиторов LecB значительно меньше.

Несмотря на огромное разнообразие синтезированных мультивалентных соединений, изучению их влияния на бактериальные клетки, их адгезию или образование биопленок посвящено сравнительно немного работ. Способностью подавлять образование биопленок обладают олигопептидные дендримеры. Один из таких дендримеров, GalAG2 (таблица, соединение 7) с четырьмя остатками галактозы, практически полностью ингибировал образование биопленок *P. aeruginosa* на стальных пластинках, а также способствовал разрушению уже сформированных биопленок. К сожалению, попытки оптимизировать аминокислотную последовательность олигопептида привели лишь к небольшому улучшению его способности разрушать сформировавшиеся биопленки, но не подавлять их рост [59, 86]. Аналогичные фукозилированные пептидные дендримеры были синтезированы как ингибиторы LecB (таблица, соединение 8) [46, 94]. Четырехвалентный дендример FD2 эффективно подавлял образование биопленок стандартным штаммом PAO1, а также тремя клиническими изолятами, но не штаммом, мутантным по гену *lecB*, и, как и GalAG2, способствовал разрушению уже сформированных биопленок. Способностью подавлять образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 обладали также четырехвалентные гликокластеры на основе каликсаренов, функционализированных галактозой и фукозой (таблица, соединения 5 и 6) [40]. Интересно, что эти гликокластеры подавляли рост биопленок не только штамма PAO1, но и мутантов по генам *lecA* и *lecB*, что говорит о возможном действии этих соединений и на другие мишени. Те же гликокластеры подавляли адгезию бактерий к клеткам линии A549 на 70 и 90% (галактозилированный

и фукозилированный гликокластеры соответственно), и это подавление было более значительным, чем при инактивации генов *lecA* или *lecB*, что также говорит о вероятности воздействия на другие мишени. Трехвалентные гликокластеры на основе тритиоциануровой кислоты, функционализированные как галактозой, так и фукозой (таблица, соединения 11 и 12), также обладают способностью подавлять образование биопленок. Хотя аффинность этих гликокластеров к соответствующим лектинам значительно ниже, их эффективные концентрации, подавляющие образование биопленок, такие же, как и у каликсаренов (5 мМ). В работе же Новои и соавт. [91] показано, что двухвалентный лиганд LecA (таблица, соединение 9) в концентрации 0.05–5 мкМ способен предотвращать проникновение *P. aeruginosa* внутрь клеток H1299 на 50–80%, хотя дозовой зависимости не выявлено.

Природные соединения

Способность связывать лектины *P. aeruginosa* выявлена не только у химически синтезированных соединений, но и у многих природных веществ. К сожалению, большинство этих веществ не были разделены на компоненты, и о природе их активных составляющих можно говорить лишь предположительно. Кроме того, способность взаимодействовать с лектинами была показана, как правило, только методами гемагглютинации и вестерн-блот-гибридизации без использования более надежных количественных методов.

С помощью гемагглютинации и вестерн-блот-гибридизации установлено, что с лектинами *P. aeruginosa* способны взаимодействовать белки голубиных и перепелиных яиц [97, 98], компоненты меда и маточного молочка [99], молока человека и некоторых других млекопитающих [66, 100], экстракты семян нескольких съедобных растений [101].

Двумя независимыми группами показано, что гемагглютинация, вызванная лектином LecA, подавляется галактоманнами – полисахаридами растительного происхождения, состоящими из линейных цепочек поли-(1→4)-маннозы, с остатками галактозы, присоединенными к некоторым остаткам маннозы 1→6-гликозидной связью [57, 102]. Кроме того, галактоманнан гуара, но не глюкан овса и некоторые другие растительные полисахариды, подавляли образование биопленок клиническим изолятом *P. aeruginosa* [102]. Предположительно, действие галактоманнана, как и пептидных дендримеров, основано на эффекте мультивалентности.

ИНГИБИРОВАНИЕ ЛЕКТИНОВ *IN VIVO*

Положительный эффект ингибирования лектинов LecA и LecB показан не только в экспериментах *in*

vitro: применение моносахаридов, специфичных к лектинам, а также синтетических ингибиторов изучали в животных моделях инфекции. Кроме того, описаны единичные случаи применения моносахаридов в клинической практике.

Так, в вышеописанных экспериментах на модели кишечной инфекции у мышей, подвергнутых гепатэктомии 30% печени, инъекция 10^7 КОЕ *P. aeruginosa* в слепую кишку приводила к 100% смертности, как и инъекция комбинации лектина LecA и экзотоксина А. Однако добавление к инъекционной смеси 13% N-ацетилгалактозамина снижало в обоих случаях смертность практически до нуля [55]. Эффект от добавления простых сахаров – лигандов лектинов, наблюдали и в мышинной модели легочной инфекции [39]. Внутритрахеальная инъекция *P. aeruginosa* PAO1 приводила к повышенной проницаемости легочного эпителия, накоплению в легких жидкости, а также диссеминации бактерий по организму. При этом заражение штаммами, мутантными по *lecA* или *lecB*, в значительно меньшей степени влияло на проницаемость легких, а также приводило к меньшей обсемененности как легких, так и крови зараженных мышей, хотя и не улучшало выживаемость по сравнению с мышами, зараженными штаммом дикого типа. Добавление сахаров, связывающихся с LecA (N-ацетилгалактозамина и метил- α -галактозида) или LecB (метил- α -фукозида) в концентрациях 15–50 мМ, но не глюкозы, уменьшало негативные эффекты, вызванные инъекцией бактерий, и обсемененность легких и крови. Более того, метил- α -галактозид и N-ацетилгалактозамин способствовали улучшению выживаемости инфицированных мышей. В той же модели острой легочной инфекции у мышей исследовали эффективность синтетических ингибиторов лектинов – четырехвалентных галактозилированных и фукозилированных гликокластеров на основе каликсаренов (таблица, соединения 5 и 6) [40]. Как и следовало ожидать, гликокластеры оказались значительно более эффективными, чем моносахариды в тех же концентрациях (1–5 мМ), как в сохранении барьерной функции легких, так и в снижении обсемененности легких и селезенки. Так, проницаемость легких для меченого альбумина при добавлении гликокластеров оказалась такой же, как при инфекции штаммами, мутантными по генам лектинов [39], а обсемененность легких и селезенки снижалась на 1–3 порядка, при этом фукозилированный гликокластер был более эффективным. К сожалению, данные по выживаемости мышей не приводятся.

Описано также несколько случаев применения растворов сахаров для терапии инфекции *P. aeruginosa* у людей. Штойер и соавт. [103] показали эффектив-

ность применения раствора D-галактозы, D-маннозы и сиаловой кислоты при наружном отите, вызванном *P. aeruginosa*, хотя в данном случае эффект мог проявляться за счет ингибирования не только лектинов, но и других адгезинов. В другой работе описан случай излечения инфекции дыхательных путей у ребенка, перенесшего химиотерапию [104]. Применение антибиотиков не помогало устранению инфекции, в то время как добавление ингаляций раствора галактозы и фукозы способствовало полной элиминации патогена. Наконец Хаубер и соавт. проводили ингаляцию растворов тех же сахаров больным муковисцидозом, чьи легкие были хронически колонизированы *P. aeruginosa* [105]. Ингаляция раствора сахаров дважды в день в течение 21 дня приводила к значимому снижению количества бактерий в мокроте больных, а также подавляло экспрессию TNF α . К сожалению, значимого улучшения показателей функции легких не наблюдалось, что связывают с недостаточным размером выборки.

Хотя эффект от применения моносахаров в рассмотренных работах зачастую невелик, последние данные показывают, что применение мультивалентных соединений может позволить обойти это ограничение, и результаты этих работ убедительно подтверждают возможность достижения положительного результата за счет ингибирования лектинов *P. aeruginosa in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лектины LecA и LecB входят, по-видимому, в число факторов вирулентности *P. aeruginosa*, внося свой вклад в способность этого организма колонизировать ткани и органы человека и персистировать на них в составе биопленок, приводя к развитию хронических заболеваний, трудно поддающихся лечению. Оба лектина влияют на способность бактерий прикрепляться к эпителиальным клеткам человека, являются важным компонентом бактериальных биопленок, а также могут подавлять движение ресничек мерцательного эпителия и нарушать барьерные функции эпителиальной ткани. К сожалению, остается неясным, насколько каждая из этих функций лектинов важна при инфекции *in vivo*. Учитывая различную специфичность лектинов, нельзя исключить и того, что LecA и LecB *P. aeruginosa* выполняют разные функции при инфицировании организма человека. Однако вне зависимости от того, какова настоящая функция лектинов, применение соответствующих моносахаридов и мультивалентных гликокластеров в животных моделях инфекции *P. aeruginosa* убедительно показывает положительный эффект ингибирования обоих лектинов, что подтверждается и клиническими данными.

Среди множества ингибиторов лектинов наиболее перспективными представляются соединения, использующие эффект мультивалентности для достижения более высокого сродства к своей мишени. Отчасти это связано с мультивалентностью самих лектинов – соединения, несущие несколько аффинных групп, могли бы связывать два мономера из одного тетрамера одновременно. С помощью молекулярного моделирования показано, что такой способностью в принципе могут обладать некоторые соединения. Обнаружена способность нескольких классов таких мультивалентных соединений подавлять развитие биопленок *P. aeruginosa* и/или препятствовать адгезии бактерий к эпителиальным клеткам, а также положительный эффект четырехвалентных гликокластеров на основе каликсаренов в модели острой легочной инфекции *in vivo*.

Большая часть мультивалентных ингибиторов лектинов представлена синтетическими гликодендимерами и гликокластерами. Стоимость и сложность синтеза многих из них может оказаться существенным препятствием для дальнейшего продвижения по пути к доклиническим и, тем более, клиническим испытаниям. Кроме того, велика вероятность проявления нежелательных токсических эффектов, а также неоптимальных фармакокине-

тических свойств. С этой точки зрения более перспективными представляются природные нейтральные полисахариды, такие, как галактоманнан, либо олигосахариды, получаемые при их гидролизе. Растительные галактоманнаны широко применяются в пищевой промышленности, безопасны и исключительно дешевы. Однако эффективность природных полисахаридов, как и большинства синтетических гликокластеров и гликодендимеров, к настоящему времени не подтверждена на животных моделях инфекции. На наш взгляд, учитывая обнадеживающие результаты, полученные в экспериментах с каликсаренами, первостепенной задачей стоит считать дальнейшую проверку эффективности природных и синтетических мультивалентных соединений *in vivo* в различных моделях инфекции, возможно, в сочетании с традиционными антибиотиками. ●

Авторы благодарят Веру Гусакову за помощь в подготовке иллюстраций, а также Анну Ершову за внимательное прочтение рукописи и полезные замечания.

Работа частично поддержана грантом Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-2038.2014.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blanc D.S., Petignat C., Janin B., Bille J., Francioli P. // Clin. Microbiol. Infect. 1998. V. 4. № 5. P. 242–247.
2. Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., van Eldere J., Glupczynski Y., van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., et al. // Clin. Microbiol. Infect. 2007. V. 13. № 6. P. 560–578.
3. Donlan R.M., Costerton J.W. // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15. № 2. P. 167–193.
4. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. № 2. P. 95–108.
5. Costerton J.W. // Science. 1999. V. 284. № 5418. P. 1318–1322.
6. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T. // Nat. Chem. Biol. 2007. V. 3. № 9. P. 541–548.
7. Gilboa-Garber N. // FEBS Lett. 1972. V. 20. № 2. P. 242–244.
8. Gilboa-Garber N., Mizrahi L., Garber N. // Can. J. Biochem. 1977. V. 55. № 9. P. 975–981.
9. Gilboa-Garber N. // Methods Enzymol. 1982. V. 83. № 1980. P. 378–385.
10. Avichezer D., Katcoff D.J., Garber N.C., Gilboa-Garber N. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 32. P. 23023–23027.
11. Gilboa-Garber N., Katcoff D.J., Garber N.C. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000. V. 29. P. 53–57.
12. Cioci G., Mitchell E.P., Gautier C., Wimmerová M., Sudakevitz D., Pérez S., Gilboa-Garber N., Imberty A. // FEBS Lett. 2003. V. 555. № 2. P. 297–301.
13. Mitchell E., Houles C., Sudakevitz D., Wimmerova M., Gautier C., Pérez S., Wu A.M., Gilboa-Garber N., Imberty A. // Nat. Struct. Biol. 2002. V. 9. № 12. P. 918–921.
14. Winzer K., Falconer C., Garber N.C., Diggle S.P., Camara M., Williams P. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 22. P. 6401–6411.
15. Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Cámara M., Williams P. // Mol. Microbiol. 2003. V. 50. № 1. P. 29–43.
16. Bjarnsholt T., Tolker-Nielsen T., Høiby N., Givskov M. // Expert Rev. Mol. Med. 2010. V. 12. e11.
17. Pessi G., Williams F., Hindle Z., Heurlier K., Holden M.T., Cámara M., Haas D., Williams P. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 22. P. 6676–6683.
18. Diggle S.P., Winzer K., Lazdunski A., Williams P., Camara M. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 10. P. 2576–2586.
19. Wu L., Estrada O., Zaborina O., Bains M., Shen L., Kohler J.E., Patel N., Musch M.W., Chang E.B., Fu Y.-X., et al. // Science. 2005. V. 309. № 5735. P. 774–777.
20. Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J. // Médecine Mal. Infect. 2006. V. 36. № 2. P. 78–91.
21. Alverdy J., Holbrook C., Rocha F., Seiden L., Wu R.L., Musch M., Chang E., Ohman D., Suh S. // Ann. Surg. 2000. V. 232. № 4. P. 480–489.
22. Kohler J.E., Zaborina O., Wu L., Wang Y., Bethel C., Chen Y., Shapiro J., Turner J.R., Alverdy J.C. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2005. V. 288. № 5. P. G1048–1054.
23. Zaborina O., Lepine F., Xiao G., Valuckaite V., Chen Y., Li T., Ciancio M., Zaborin A., Petrof E.O., Petroff E., et al. // PLoS Pathog. 2007. V. 3. № 3. e35.
24. Glick J., Garber N. // J. Gen. Microbiol. 1983. V. 129. № 10. P. 3085–3090.
25. Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K.-E. // Microbiology. 2005. V. 151. Pt 5. P. 1313–1323.
26. Funken H., Bartels K.-M., Wilhelm S., Bocker M., Bott M.,

- Bains M., Hancock R.E.W., Rosenau F., Jaeger K.-E. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 10. e46857.
27. Fito-Boncompte L., Chapalain A., Bouffartigues E., Chaker H., Lesouhaitier O., Gicquel G., Bazire A., Madi A., Connil N., Véron W., et al. // *Infect. Immun.* 2011. V. 79. № 3. P. 1176–1186.
28. Gilboa-Garber N., Sudakevitz D., Sheffi M., Sela R., Levene C. // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11. № 5. P. 414–417.
29. Lanne B., Ciopraga J., Bergström J., Motas C., Karlsson K.A. // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11. № 4. P. 292–298.
30. Chen C.P., Song S.C., Gilboa-Garber N., Chang K.S., Wu A.M. // *Glycobiology*. 1998. V. 8. № 1. P. 7–16.
31. Blanchard B., Nurisso A., Hollville E., Tétaud C., Wiels J., Pokorná M., Wimmerová M., Varrot A., Imberty A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 383. № 4. P. 837–853.
32. Perret S., Sabin C., Dumon C., Pokorná M., Gautier C., Galanina O., Ilia S., Bovin N., Nicaise M., Desmadril M., et al. // *Biochem. J.* 2005. V. 389. Pt 2. P. 325–332.
33. Kirkeby S., Hansen A.K., d'Apice A., Moe D. // *Microb. Pathog.* 2006. V. 40. № 5. P. 191–197.
34. Kirkeby S., Wimmerová M., Moe D., Hansen A.K. // *Microbes Infect.* 2007. V. 9. № 5. P. 566–573.
35. Imberty A., Wimmerová M., Mitchell E.P., Gilboa-Garber N. // *Microbes Infect.* 2004. V. 6. № 2. P. 221–228.
36. Wentworth J.S., Austin F.E., Garber N., Gilboa-Garber N., Paterson C.A., Doyle R.J. // *Biofouling*. 1991. V. 4. № 1–3. P. 99–104.
37. Rebiere-Huët J., Di Martino P., Hulen C. // *Can. J. Microbiol.* 2004. V. 50. № 5. P. 303–312.
38. Sonawane A., Jyot J., Ramphal R. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. № 12. P. 7035–7039.
39. Chemani C., Imberty A., de Bentzmann S., Pierre M., Wimmerová M., Guery B.P., Faure K. // *Infect. Immun.* 2009. V. 77. № 5. P. 2065–2075.
40. Boukerb A.M., Rousset A., Galanos N., Méar J.-B., Thépaut M., Grandjean T., Gillon E., Cecioni S., Abderrahmen C., Faure K., et al. // *J. Med. Chem.* 2014. V. 57. № 24. P. 10275–10289.
41. Nosková L., Kubíčková B., Vašková L., Bláhová B., Wimmerová M., Stiborová M., Hodek P. // *Sensors*. 2015. V. 15. № 1. P. 1945–1953.
42. Eierhoff T., Bastian B., Thuenauer R., Madl J., Audfray A., Aigal S., Juillot S., Rydell G.E., Müller S., de Bentzmann S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 35. P. 12895–12900.
43. Scharfman A., Arora S.K., Delmotte P., van Brussel E., Mazurier J., Ramphal R., Roussel P. // *Infect. Immun.* 2001. V. 69. № 9. P. 5243–5248.
44. Hahn H.P. // *Gene*. 1997. V. 192. № 1. P. 99–108.
45. Diggle S.P., Stacey R.E., Dodd C., Cámara M., Williams P., Winzer K. // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. № 6. P. 1095–1104.
46. Johansson E.M.V., Cruz S.A., Kolomiets E., Buts L., Kadam R.U., Cacciarini M., Bartels K.-M., Diggle S.P., Cámara M., Williams P., et al. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. № 12. P. 1249–1257.
47. Ma L., Lu H., Sprinkle A., Parsek M.R., Wozniak D.J. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 22. P. 8353–8356.
48. Byrd M.S., Sadovskaya I., Vinogradov E., Lu H., Sprinkle A.B., Richardson S.H., Ma L., Ralston B., Parsek M.R., Anderson E.M., et al. // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 73. № 4. P. 622–638.
49. Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M.R., Bayles K., Wozniak D.J. // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 3. e1000354.
50. Bajolet-Laudinat O., Girod-De Bentzmann S.G., Tournier J.M., Madoulet C., Plotkowski M.C., Chippaux C., Puchelle E. // *Infect. Immun.* 1994. V. 62. № 10. P. 4481–4487.
51. Mewe M., Tielker D., Schönberg R., Schachner M., Jaeger K.-E., Schumacher U. // *J. Laryngol. Otol.* 2005. V. 119. № 8. P. 595–599.
52. Gustke H., Kleene R., Loers G., Nehmann N., Jaehne M., Bartels K.-M., Jaeger K.-E., Schachner M., Schumacher U. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. V. 31. № 2. P. 207–215.
53. Adam E.C., Mitchell B.S., Schumacher D.U., Grant G., Schumacher U. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997. V. 155. № 6. P. 2102–2104.
54. Adam E.C., Schumacher D.U., Schumacher U. // *J. Laryngol. Otol.* 1997. V. 111. № 8. P. 760–762.
55. Laughlin R.S., Musch M.W., Hollbrook C.J., Rocha F.M., Chang E.B., Alverdy J.C. // *Ann. Surg.* 2000. V. 232. № 1. P. 133–142.
56. Wu L., Holbrook C., Zaborina O., Ploplys E., Rocha F., Pelham D., Chang E., Musch M., Alverdy J. // *Ann. Surg.* 2003. V. 238. № 5. P. 754–764.
57. Zinger-Yosovich K.D., Gilboa-Garber N. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. № 15. P. 6908–6913.
58. Nurisso A., Blanchard B., Audfray A., Rydner L., Oscarson S., Varrot A., Imberty A. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 26. P. 20316–20327.
59. Kadam R.U., Bergmann M., Hurley M., Garg D., Cacciarini M., Swiderska M.A., Nativi C., Sattler M., Smyth A.R., Williams P., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011. V. 50. № 45. P. 10631–10635.
60. Garber N., Guempel U., Belz A., Gilboa-Garber N., Doyle R.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. V. 1116. № 3. P. 331–333.
61. Stoitsova S.R., Boteva R.N., Doyle R. // *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 2003. V. 1619. № 2. P. 213–219.
62. Boteva R.N., Bogoeva V.P., Stoitsova S.R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1747. № 2. P. 143–149.
63. Loris R., Tielker D., Jaeger K.-E., Wyns L. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 331. № 4. P. 861–870.
64. Garber N., Guempel U., Gilboa-Garber N., Doyle R. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1987. V. 48. № 3. P. 331–334.
65. Sabin C., Mitchell E.P., Pokorná M., Gautier C., Utile J.-P., Wimmerová M., Imberty A. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 3. P. 982–987.
66. Lesnan-Movshovich E., Lerrer B., Gilboa-Garber N. // *Can. J. Microbiol.* 2003. V. 49. № 3. P. 230–235.
67. Wu A.M., Wu J.H., Singh T., Liu J.-H., Tsai M.-S., Gilboa-Garber N. // *Biochimie*. 2006. V. 88. № 10. P. 1479–1492.
68. Kadam R.U., Garg D., Schwartz J., Visini R., Sattler M., Stocker A., Darbre T., Reymond J.-L. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 9. P. 1925–1930.
69. Rodrigue J., Ganne G., Blanchard B., Saucier C., Giguère D., Shiao T.C., Varrot A., Imberty A., Roy R. // *Org. Biomol. Chem.* 2013. V. 11. № 40. P. 6906–6918.
70. Cecioni S., Praly J.-P., Matthews S.E., Wimmerová M., Imberty A., Vidal S. // *Chemistry*. 2012. V. 18. № 20. P. 6250–6263.
71. Gening M.L., Titov D.V., Cecioni S., Audfray A., Gerbst A.G., Tsvetkov Y.E., Krylov V.B., Imberty A., Nifantiev N.E., Vidal S. // *Chemistry*. 2013. V. 19. № 28. P. 9272–9285.
72. Marotte K., Sabin C., Prévile C., Moumé-Pymbock M., Wimmerová M., Mitchell E.P., Imberty A., Roy R. // *ChemMedChem*. 2007. V. 2. № 9. P. 1328–1338.
73. Andreini M., Anderluh M., Audfray A., Bernardi A., Imberty A. // *Carbohydr. Res.* 2010. V. 345. № 10. P. 1400–1407.
74. Hauck D., Joachim I., Frommeyer B., Varrot A., Philipp B., Möller H.M., Imberty A., Exner T.E., Titz A. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 8. P. 1775–1784.
75. Dam T.K., Brewer C.F. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 2. P. 387–429.
76. Wittmann V., Pieters R.J. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42. № 10. P. 4492–4503.

77. Dam T.K., Brewer C.F. // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 2010. V. 63. № 10. P. 139–164.
78. Imberty A., Chabre Y.M., Roy R. // *Chemistry*. 2008. V. 14. № 25. P. 7490–7499.
79. Smadhi M., de Bentzmann S., Imberty A., Gingras M., Abderrahim R., Goekjian P.G. // *Beilstein J. Org. Chem.* 2014. V. 10. P. 1981–1990.
80. Cecioni S., Lalor R., Blanchard B., Praly J.-P., Imberty A., Matthews S.E., Vidal S. // *Chemistry*. 2009. V. 15. № 47. P. 13232–13240.
81. Cecioni S., Faure S., Darbost U., Bonnamour I., Parrot-Lopez H., Roy O., Taillefumier C., Wimmerová M., Praly J.-P., Imberty A., et al. // *Chemistry*. 2011. V. 17. № 7. P. 2146–2159.
82. Soomro Z.H., Cecioni S., Blanchard H., Praly J.-P., Imberty A., Vidal S., Matthews S.E. // *Org. Biomol. Chem.* 2011. V. 9. № 19. P. 6587–6597.
83. Cecioni S., Oerthel V., Iehl J., Holler M., Goyard D., Praly J.-P., Imberty A., Nierengarten J.-F., Vidal S. // *Chemistry*. 2011. V. 17. № 11. P. 3252–3261.
84. Otsuka I., Blanchard B., Borsali R., Imberty A., Kakuchi T. // *ChemBioChem*. 2010. V. 11. № 17. P. 2399–2408.
85. Reynolds M., Marradi M., Imberty A., Penadés S., Pérez S. // *Chemistry*. 2012. V. 18. № 14. P. 4264–4273.
86. Kadam R.U., Bergmann M., Garg D., Gabrieli G., Stocker A., Darbre T., Reymond J.-L. // *Chemistry*. 2013. V. 19. № 50. P. 17054–17063.
87. Chabre Y.M., Giguère D., Blanchard B., Rodrigue J., Rocheleau S., Neault M., Rauthu S., Papadopoulos A., Arnold A.A., Imberty A., et al. // *Chemistry*. 2011. V. 17. № 23. P. 6545–6562.
88. Gerland B., Goudot A., Ligeour C., Pourceau G., Meyer A., Vidal S., Gehin T., Vidal O., Souteyrand E., Vasseur J.J., et al. // *Bioconjug. Chem.* 2014. V. 25. P. 379–392.
89. Pertici F., Pieters R.J. // *Chem. Commun. (Camb.)*. 2012. V. 48. № 33. P. 4008–4010.
90. Pertici F., de Mol N.J., Kemmink J., Pieters R.J. // *Chemistry*. 2013. V. 19. № 50. P. 16923–16927.
91. Novoa A., Eierhoff T., Topin J., Varrot A., Barluenga S., Imberty A., Römer W., Winssinger N. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. № 34. P. 8885–8889.
92. Morvan F., Meyer A., Jochum A., Sabin C., Chevolut Y., Imberty A., Praly J.-P., Vasseur J.-J., Souteyrand E., Vidal S. // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. № 5. P. 1637–1643.
93. Berthet N., Thomas B., Bossu I., Dufour E., Gillon E., Garcia J., Spinelli N., Imberty A., Dumy P., Renaudet O. // *Bioconjug. Chem.* 2013. V. 24. № 9. P. 1598–1611.
94. Kolomiets E., Swiderska M.A., Kadam R.U., Johansson E.M.V., Jaeger K.-E., Darbre T., Reymond J.-L. // *ChemMedChem*. 2009. V. 4. № 4. P. 562–569.
95. Johansson E.M.V., Kadam R.U., Rispoli G., Crusz S.A., Bartels K.-M., Diggle S.P., Cámara M., Williams P., Jaeger K.-E., Darbre T., et al. // *Med. Chem. Commun.* 2011. V. 2. № 5. P. 418–420.
96. Marotte K., Préville C., Sabin C., Moumé-Pymbock M., Imberty A., Roy R. // *Org. Biomol. Chem.* 2007. V. 5. № 18. P. 2953–2961.
97. Lerrer B., Gilboa-Garber N. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001. V. 32. № 1. P. 33–36.
98. Lerrer B., Gilboa-Garber N. // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. № 1. P. 8–14.
99. Gilboa-Garber N., Zinger-Yosovich K., Lerrer B. // *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* 2009. V. 1. № 3. P. 82–89.
100. Zinger-Yosovich K.D., Iluz D., Sudakevitz D., Gilboa-Garber N. // *J. Dairy Sci.* 2010. V. 93. № 2. P. 473–482.
101. Rachmaninov O., Zinger-Yosovich K.D., Gilboa-Garber N. // *Nutr. J.* 2012. V. 11. № 1. P. 10.
102. Grishin A., Karyagina A.S., Tiganova I.G., Dobrynina O.Y., Bolshakova T.N., Boksha I.S., Alexeyeva N.V., Stepanova T.V., Lunin V.G., Chuchalin A.G., et al. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2013. V. 42. № 5. P. 471–472.
103. Steuer M.K., Herbst H., Beuth J., Steuer M., Pulverer G., Matthias R. // *Oto-Rhino-Laryngologia Nov.* 1993. V. 3. № 1. P. 19–25.
104. von Bismarck P., Schneppenheim R., Schumacher U. // *Klin. Pädiatrie*. 2001. V. 213. № 5. P. 285–287.
105. Hauber H.-P., Schulz M., Pforte A., Mack D., Zabel P., Schumacher U. // *Int. J. Med. Sci.* 2008. V. 5. № 6. P. 371–376.