

39. Sommer F., Backhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11(4): 227-238.
40. Sonoyama K., Ogasawara T., Goto H. et al. Comparison of gut microbiota and allergic reactions in BALB/c mice fed different cultivars of rice. *Br. J. Nutr.* 2010, 103: 218-226.
41. Swidsinski A., Dorffel Y., Loening-Baucke V. et al. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut.* 2011, 60: 34-40.
42. Tailford L.E., Crost E.H., Kavanaugh D., Juge N. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* 2015, 6: 81. Doi: 10.3389/fgene.2015.00081.
43. Tan L., Zhao S., Zhu W. et al. The *Akkermansia muciniphila* is a gut microbiota signature in psoriasis. *Exp. Dermatol.* 2018, 27(2): 144-114.
44. Van der Ark K.C.H. Metabolic characterization and viable delivery of *Akkermansia muciniphila* for its future application. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. 2018. DOI: 10.18174/427507.
45. Van Passel M.W.J., Kant R., Zoetendal E. The Genome of *Akkermansia muciniphila*, a Dedicated Intestinal Mucin Degrader, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes. *PLoS ONE.* 2011, 6(3): e16876. Doi: 10.1371/journal.pone.0016876.
46. Wang X., Wang J., Rao B., Deng L. Gut flora profiling and fecal metabolite composition of colorectal cancer patients and healthy individuals, *Exp. Ther. Med.* 2017, 3: 2848-2854.
47. Wang L., Christophersen C.T., Soric M.J. et al. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77: 6718-6721.
48. Weir T.L., Manter D.K., Sheflin A.M. et al. Stool Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults. *PLoS One.* 2013, 8: e70803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070803>.
49. Zhang Y.J., Li S., Gan R.Y. et al. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16: 7493-7519.
50. Zhou K. Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies. *J. Functionl. Foods.* 2017, 33: 194-201.

Поступила 22.01.19

Контактная информация; Шендеров Борис Аркадьевич, д.м.н., проф.,
119121, Москва, Погодинская ул., 10. стр 1, р.т. (499)248-43-93

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Б.Г.Андрюков, Л.М.Сомова, М.П.Бынина, И.Н.Ляпун

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СОХРАНЕНИЯ ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ САПРОНОЗОВ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток

Для межэпидемических периодов природно-очаговых сапронозов характерны различные способы сохранения жизнеспособности возбудителей в наземных паразитарных системах, связанные с различными адаптационными стратегиями, необходимыми для сохранения популяции. В отличие от спорообразующих бактерий, возбудители сапронозов используют устойчивые клеточные формы — жизнеспособное, но некультивируемое состояние (VBNC) и персистенцию. Реализация этих стратегий обусловлена влиянием различных стрессорных факторов среды обитания и характеризуется снижением метаболизма, изменением морфологии и физиологии бактериальной клетки, прекращением ее репликации. Важно, что устойчивые формы клеток сохраняют вирулентность и при наступлении благоприятных условий вновь трансформируются в активные вегетативные формы. Открытие в последние годы генетических модулей бактериальных токсин-антитоксиновых систем позволило раскрыть сложные регуляторные молекулярные меха-

низмы сохранения патогенного потенциала устойчивых форм возбудителей природно-очаговых сапронозов в межэпидемические периоды.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 115—126

Ключевые слова: сапронозы, устойчивые клеточные формы бактерий, токсин-антитоксин генетические модули, жизнеспособные, но некультивируемые (VBNC) клетки, персистенция

B.G.Andryukov, L.M.Somova, M.P.Bynina, I.N.Lyapun

MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS OF CONSERVATION OF THE PATHOGENIC POTENTIAL OF THE CAUSATIVE AGENTS ENVIRONMENTS OF NATURAL-FOCUS SAPRONOSIS

Somov State Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

For interepidemic periods of natural focal sapronoses, various ways of maintaining the viability of pathogens in terrestrial parasitic systems are associated with various adaptation strategies necessary for the conservation of the population. Unlike spore-forming bacteria, sapronose pathogens use stable cellular forms — a viable but uncultivated state and persistence. The implementation of these strategies is due to the influence of various stress factors of the habitat and is characterized by a decrease in metabolism, a change in the morphology and physiology of the bacterial cell, and the cessation of its replication. It is important that stable forms of cells retain virulence and, when favorable conditions come, they are again transformed into active vegetative forms. The discovery in recent years of genetic modules of bacterial toxin-antitoxin systems has made it possible to uncover complex regulatory molecular mechanisms for preserving the pathogenic potential of stable forms of pathogens of natural focal sapronoses in interepidemic periods.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 115—126

Key word: sapronoses, resistant cell forms of bacteria, toxin-antitoxin genetic modules, viable but non-culturable (VBNC) cells, persistence

Проблема сохранения патогенных микроорганизмов и способов их существования в окружающей среде стала одной из актуальных в современной микробиологии. Эндемичность природно-очаговых сапронозов связана со способностью их возбудителей сохраняться в природных экосистемах [6, 18].

Эколого-эпидемиологическое изучение сапронозных инфекций имеет не только медицинское, но и общебиологическое значение, поскольку, несмотря на достаточно длительную историю изучения сапронозов, появляющиеся новые представления о симбиотических отношениях, паразитарных системах и адаптационных стратегиях их возбудителей все больше расходятся с классическими эпидемиологическими и биологическими концепциями [1]. Отчасти это сопряжено с отсутствием единого взгляда на терминологию и экологические особенности возбудителей при их циркуляции в природных условиях и в организме человека [2, 3, 18].

Парадигма межэпидемических периодов предполагает два способа существования возбудителей: активный (циркуляция вне наземной паразитарной системы, в почвах или водоемах) и пассивный (резервация в покоящемся, неактивном состоянии).

В конце прошлого века было доказано существование устойчивых (покоящихся, дремлющих, спящих) клеточных форм у неспорообразующих бактерий, обитающих в почвах и водоемах, жизнеспособных, но некультивируемых клеток (viable, but non-culturable, VBNC), а также явления персистенции бактерий (persister — устойчивый) в организме теплокровных животных и людей [1, 2, 18].

Устойчивые клеточные формы с низкой метаболической и репликативной активностью не обнаруживаются традиционными микробиологическими методами [27, 49]. Эти формы имеют большое значение в реализации биологичес-

ких свойств многочисленной и разнообразной группы возбудителей сапронозов: экологической пластичности, многообразии форм устойчивости к внешним стрессорам, формирование резистентности к антибиотикам и другим антибактериальным средствам [2, 16].

В последние годы всплеск научного интереса к устойчивым формам возбудителей инфекций связан с возрастающим медико-эпидемиологическим значением феномена устойчивых клеточных форм, а также появлением и развитием методов молекулярно-клеточной биологии, открытием генетических модулей токсин-антитоксिनных систем (ТАС) [1]. Это послужило основанием для разработки принципиально новых технологий исследования механизмов сохранения патогенного потенциала устойчивых клеточных форм возбудителей природно-очаговых сапронозов в межэпидемические периоды [2, 18].

Пограничное положение этой своеобразной и обширной группы бактерий, способных как к паразитическому, так и к сапрофитическому существованию, обусловило недостаточную изученность путей и способов резервации возбудителей, а также сохранения ими вирулентности [5]. Возможно, что раскрытие механизмов участия ТАС в формировании устойчивых форм бактерий станет недостающим звеном в изучении общих стратегий выживания возбудителей природно-очаговых сапронозов как в организме человека и животных, так и во внешней среде.

Цель обзора: показать значение генетических модулей ТАС в возникновении устойчивых форм бактериальных клеток и сохранении патогенного потенциала возбудителей природно-очаговых сапронозов.

Возбудители природно-очаговых сапронозов. Сапронозы (сапрос — гнилой и *posos* — болезнь) — это болезни, передающиеся человеку из абиотических субстратов окружающей среды (почвы, воды, разлагающихся растений, экскрементов животных и других) [6].

Наиболее важная особенность сапронозов в том, что бактерии-возбудители не только сохраняются, но и активно размножаются в абиотических субстратах (сапрофитическая фаза), а попав в организм теплокровного животного (или человека), продолжают репликацию и в нем (паразитическая фаза). Возможными источниками возбудителей являются животные, что стало основанием назвать эту группу инфекций сапрозоонозами [18].

К возбудителям инфекций данной группы относятся *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Erysipelothrix*, *Bacillus anthracis*, *Leptospira interrogans*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* spp. и другие бактерии, главным естественным местом обитания которых являются абиотические объекты окружающей среды [2].

В основе патогенных свойств возбудителей природно-очаговых сапронозов лежат генетически детерминированные факторы патогенности (адгезины, инвазины, ферменты, токсины и др.), которые сформировались у них в процессе эволюции для существования в объектах окружающей среды и проникновения в клетки и ткани представителей почвенной, водной, морской флоры и фауны [2, 4]. Эти универсальные факторы патогенности благодаря комплементарности детерминант могут воздействовать на соответствующие химические мишени как в объектах внешней среды, так и в организме теплокровных животных и человека [5].

Парадигма о природной очаговости болезней в течение длительного времени опиралась на постулат о постоянной циркуляции возбудителей на определенной территории. Однако в последние десятилетия был выдвинут и обоснован тезис о межэпидемических (межэпизоотических) периодах и дискретности процесса циркуляции возбудителей (сезонных, годовых, многолетних) как о закономерной особенности природных очагов [2, 3, 5]. Стало очевидно, что в наземных экосистемах циркуляция возбудителей сапронозов (чумы, псевдотуберкулеза, лептоспироза,

листериоза, мелиоидоза, легионеллеза, холеры, туляремии, сибирской язвы) также ограничена во времени и пространстве [5].

Например, перерывы в активной циркуляции *Yersinia pestis* могут длиться десятки лет [2, 5]. Дискретность обращения возбудителей сапронозов выражена и в эпидемических проявлениях холеры и других инфекций, природная очаговость которых связана с водными и наземными системами [1, 5].

Таким образом, обитающие в окружающей среде возбудители типичных сапронозов могут существовать и размножаться без всякой связи с теплокровными организмами и приобретают эпидемиологическое значение, когда появляется возможность передачи их из естественных мест обитания в организм теплокровного животного (или человека), где они продолжают репликацию. Наличие двух сред обитания способствует сохранению их в биосфере и определяет их дальнейшую эволюцию в этом направлении [1, 3, 5, 6, 18].

Как обитатели разных экосистем возбудители сапронозов постоянно сталкиваются с потенциально опасными неблагоприятными факторами, что обусловило необходимость формирования ими в процессе эволюции определенных адаптационных стратегий генетической саморегуляции [1, 3, 18].

Эти стратегии обеспечивают не только высокую экологическую пластичность микроорганизмов-сапрофитов, но и возможность сохранения возбудителей, обладающих значительным инфекционным потенциалом, в условиях влияния многочисленных факторов окружающей среды и организма человека. Источником сапронозных инфекций может служить и госпитальная среда: медицинские приборы и оборудование, трансплантаты и биологические жидкости, на которых возбудители сохраняются в течение длительного времени в виде биопленок, устойчивых клеточных форм, спор. Это обеспечивает фазовое развитие эпидемических проявлений внутригоспитальных инфекций с периодическим доминированием мультирезистентных клонов [24, 32, 33].

Известно, что спорообразующие патогенные бактерии (кlostридии, бациллы) в условиях резкого ограничения питательных веществ в среде обитания могут десятилетиями сохраняться в почвах в виде покоящихся форм — спор или цист до наступления благоприятных для размножения условий. Например, споры *Bacillus anthracis*, возбудителя сибирской язвы, при благоприятных условиях способны прорасти в почве, осуществляя полный вегетативный цикл [27].

В конце XX века было доказано существование покоящихся устойчивых («дремлющих») клеточных форм у неспорообразующих бактерий, обитающих в почвах и водоемах и находящихся в организме теплокровных животных и людей [13]. Субпопуляции этих клеточных форм отличаются сниженными темпами роста и метаболической активности, но при наступлении оптимальных условий роста обладают способностью к быстрому восстановлению тех патогенных характеристик, которые имели ранее [27, 49].

Эволюционная значимость поддержания такой гетерогенности популяции аналогична генетическим стратегиям формирования фенотипов, обусловленных генотипом и условиями внешней среды, увеличивающими вероятность выживания микроорганизмов в условиях нестабильности экологических условий, а также действия антибактериальных средств [16].

Образование устойчивых форм у возбудителей сапронозов вызвано рядом стрессорных факторов среды обитания (изменением гидротермического режима, дефицитом питательных веществ, воздействием антибиотиков и другими) и имеет выраженную адаптивную природу [6, 49].

Возбудители сапронозов, переходя в некультивируемое состояние, получают возможность длительного существования во внешней среде, вне теплокровного организма. При этом неактивные клетки сохраняют свой патогенный потенциал и

при наступлении благоприятных условий вновь трансформируются в вегетативные формы [27].

К настоящему времени устойчивые (покоящиеся) формы выделены у многих бактерий, в том числе возбудителей природно-очаговых инфекций (чумы, псевдотуберкулеза, листериоза и других сапронозов) [16, 32]. Обнаружение этих форм возбудителей сапронозов в очагах, в почвах и водоемах было подкреплено результатами экспериментальных исследований по индукции процессов реверсивного перехода иерсиний, листерий, и сальмонелл в покоящееся состояние [3, 5, 18].

После открытия этих адаптационных феноменов было предположено, что механизмы реверсивного перехода бактерий в покоящееся состояние и обратный переход в вегетативные (активные) формы имеют сложную генетическую регуляцию, а их индукция обусловлена сочетанием комплекса биотических и абиотических факторов среды обитания [2, 4, 6].

Сезонные и климатические сдвиги выраженности этих факторов способны вызывать адаптивную перестройку микробных популяций и индуцировать переход вегетативных форм, присущих фазе циркуляции возбудителей, в покоящееся состояние, обеспечивающее их резервацию в межэпидемических периодах в природных очагах, а также вызывать обострение, рецидивы и хронизацию инфекции [1, 3, 10, 38].

В настоящее время хорошо охарактеризованы две четко определенные устойчивые формы у неспорообразующих бактерий: жизнеспособное, но некультивируемое состояние (VBNC) и персистенция клеток.

Устойчивые клеточные формы. Культивирование микроорганизмов — одна из фундаментальных микробиологических характеристик, а координированное воспроизведение всех клеточных компонентов и структур, ведущее в конечном итоге к увеличению массы клетки — один из главных критериев ее жизнеспособности. Однако в XX веке у микроорганизмов были открыты анабиотические формы существования, которые не в полной мере отвечали критерию жизнеспособности. Это клетки-персистеры и жизнеспособные, но некультивируемые бактерии, которые были объединены под общим названием «покоящиеся клеточные формы» [27, 47].

Клетки-персистеры. Эффект персистенции бактериальных клеток был открыт в середине прошлого века. В последующих многочисленных исследованиях феномен персистенции бактерий был подробно изучен [6-8, 12, 29, 36]. В частности, было установлено, что клетки-персистеры обычно составляют лишь небольшую часть бактериальной популяции. В штаммах *E. coli* дикого типа их частота в планктонных культурах лишь около одной на миллион клеток [10, 21]. Однако в биопленках, сложных многоклеточных бактериальных сообществах, которые обладают высокой устойчивостью к антибиотикам и ответственны за более чем 80% инфекций человека, их частота существенно возрастает — до одной из ста бактерий [21].

Механизм формирования временной антибиотикорезистентности клеток-персистеров связан с репликативным и метаболическим покоем бактерий, находящихся в персистентном состоянии [32, 47]. Механизм действия большинства антибиотиков направлен на подавление жизненно важных внутриклеточных процессов метаболически активных и растущих клеток, поэтому эффективность этих препаратов зависит от физиологического состояния клетки. С этих позиций эффект персистенции представляется как появление спонтанных и временно устойчивых к антибиотикам фенотипических клеточных вариантов в изогенных бактериальных популяциях [32].

В современном определении клетки-персистеры рассматриваются как покоящиеся и нерегулярные субпопуляции, находящиеся в растущей культуре, которые устойчивы к нескольким типам антибиотиков, антисептикам и дезинфектантам [9, 16, 32]. Принципиальное их отличие от антибиотикорезистентных бактерий-му-

тантов в том, что клетки-персистеры не делятся, а их толерантный фенотип сохраняется только в период состояния покоя и, следовательно, не наследуется [21, 26].

Казалось бы, механизм фенотипической антибиотикорезистентности клеток-персистеров связан исключительно с состоянием метаболического и репликативного покоя. Однако недавние исследования [7, 8, 12, 24] показали физиологическую неоднородность фракции клеток-персистеров в популяции и разную степень устойчивости к различным антибиотикам [24]. Экспериментальное селективное ингибирование репликации бактерий вызывало резистентность к антибиотикам только тогда, когда оно сопровождалось активным ответом клеток на стресс. Другие исследователи [34, 47] показали, что подавление только метаболической активности бактериальных клеток не препятствовало гибели 99% популяции от антибактериальных средств.

Кроме того, в работах E. Maisonneuve et al. [29] и Van den Bergh et al. [42] отражено, что фенотипическая популяция единичных клеток-персистеров присутствует в большинстве бактериальных культур, находящихся в стационарной фазе роста и в отсутствии влияния антибиотиков и стресса. В процессе жизнедеятельности вегетативные (активные) бактериальные клетки популяций могут трансформироваться в персистентный фенотип и обратно, при этом скорость таких реверсий ориентирована на фазы роста и условия среды обитания [29, 42].

Таким образом, сделан вывод, что индукция образования клеток-персистеров не связана исключительно с влиянием антибактериальных средств, а уровни бактериальной персистенции зависят от нескольких факторов окружающей среды и генетически детерминированного механизма регуляции их формирования [16, 32, 47]. Эти клетки защищают популяцию от гибели, связанной с внезапной и массивной антибиотикотерапией, давая конкурентное преимущество микроорганизмам в периодически изменяющихся условиях среды обитания [32, 47].

Присутствие клеток-персистеров в бактериальной культуре, в том числе, возбудителей сапронозов, имеет и возрастающее патогенетическое значение в качестве этиологического фактора групп хронических, а также нозокомиальных инфекций (гноино-септические инфекции, пневмонии, кишечные инфекции, столбняк, газовая гангрена и др.) [1, 34].

Жизнеспособные, но некультивируемые клетки. Сапрофитическая фаза возбудителей сапронозов в природных экосистемах нередко проходит в неблагоприятных условиях существования. Нестабильный гидротермический режим, недостаток питательных веществ и другие стрессорные факторы среды обитания угрожают выживанию популяции, что заставляет бактериальные клетки, кардинально изменяя свою физиологическую и морфологическую организацию, входить в устойчивые покоящиеся состояния, приобретая способность сохраняться в агрессивных условиях среды обитания.

В отличие от нормальных бактерий, жизнеспособные, но некультивируемые (VBNC) клетки теряли способность культивироваться на питательных средах и формировать колонии, сохранив при этом признаки жизнеспособности (интактность клеточных мембран, минимальная метаболическая активность, продолжающаяся экспрессия генов) [27]. Установлено, что состояние VBNC индуцируется различными стрессорами окружающей среды (голодание, гипоксия, изменение гидротермического режима и pH, повышение солености, антибактериальные средства, дезинфектанты) [33, 49].

За последние десятилетия некультивируемые формы были обнаружены более чем у 100 видов бактерий, относящихся к 40 родам, из них свыше 50 видов являются патогенными или условно патогенными для человека и животных. Эти клеточные формы бактерий упоминались в научной литературе под различными альтернативными названиями: некультивируемые клетки, условно жизнеспособ-

ные экологические клетки (conditionally viable environmental cells, CVEC), активные, но некультивируемые клетки (active but nonculturable cells, ABNC), спящие (дремлющие) клетки [38].

Клиническое значение некультивируемых форм было подтверждено в многочисленных исследованиях [49]. Патогенные бактерии, находящиеся в состоянии VBNC, не высеваются из биоматериала на лабораторных диагностических питательных средах и, следовательно, не могут быть идентифицированы в качестве этиологического агента. Отрицательный микробиологический ответ может повлечь за собой отмену антибиотикотерапии и в дальнейшем вызвать рецидив инфекции. В исследовании М.М. Leo et al. [28] было показано, что в 14–27% случаев инфицирования патогены оказались нераспознанными традиционными микробиологическими методами, а их наличие удалось выявить только с помощью ПЦР. Этим же методом было обнаружено количественное увеличение субпопуляции некультивируемых форм бактериальных клеток в биопленках. Это повышает их значимость в патогенезе бактериальных инфекций человека и стимулирует активные исследования для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе феномена персистенции и его регуляции [37].

К настоящему времени накоплено достаточно много убедительных доказательств, что VBNC, как и персистенция, являются эффективными клеточными стратегиями выживания бактерий в неблагоприятных условиях роста. За десятилетия исследований этих устойчивых (дормантных) форм были собраны многочисленные сведения о регуляторной, морфологической и функциональной близости феноменов персистенции и состояния VBNC, и это сходство подробно обсуждалось в литературе [20].

На основании схожести условий возникновения, морфологических признаков и молекулярно-генетических механизмов этих устойчивых форм некоторые авторы ставят между ними знак равенства [20]. Впрочем, большинство исследователей указывает и на различия, которые были многократно подтверждены экспериментально. Основное отличие VBNC связано с их неспособностью быстро восстанавливать параметры роста после прекращения действия стрессоров (требуется до 24 ч и более), в то время как персистеры сразу после прекращения действия антибиотиков рекультивируются *in vivo* на твердых питательных средах. В отсутствие морфологических отличий, время начала роста после нормализации условий является основным патогномичным признаком, позволяющим отличить VBNC от клеток-персистеров [9]. Важно отметить, что после рекультивации восстанавливается и вирулентность бактерий.

В работе М. Ayrapetyan et al. [9] на основании единого молекулярно-генетического механизма регуляции обе устойчивые формы на различных физиологических уровнях были объединены в модель «континуума покоя».

Механизм появления устойчивых форм в популяции бактериальных клеток большинством авторов соотносился со стохастической изменчивостью их свойств, определяемых генами, окружающей средой и случайным шумом, который неизбежно присутствует на всех уровнях биологической организации, начиная с молекулярного [37]. Однако в конце прошлого века у прокариот были выявлены генетические локусы токсин-антитоксиновых систем (ТАС) и раскрыта их основная роль в клеточной физиологии, которая заключается в снижении метаболизма в стрессовых условиях [29, 45]. Как показано ниже, в формировании персистентности бактерий эти локусы играют решающую роль, для понимания которой необходимо более детально остановиться на структуре и функции ТАС.

Токсин-антитоксиновая система (ТАС). Современные достижения в области геномного секвенирования и биоинформатики нового поколения выявили высокую распространенность бактериальных токсин-антитоксиновых систем (ТАС), что пос-

лужило мощным стимулом для активизации глубоких исследований этих уникальных белковых структур [43]. Генетические модули ТАС содержат два гена, кодирующие стабильный токсин и нестабильный антитоксин, чувствительный к деградации клеточными протеазами.

В нормальных условиях токсин и антитоксин находятся в связанном состоянии, образуя плотный, нетоксичный комплекс. Однако при стрессе, связанном с появлением неблагоприятных условий окружающей среды, антитоксины деградируются при участии АТФ-зависимой Lon-протеазы либо сериновых бактериальных протеазных систем ClpXP, ClpCP и ClpAP. Это приводит к резкому снижению как скорости трансляции, так и репликации, а также и прекращению роста клеток вследствие цитотоксического эффекта токсина [43].

Дальнейшие исследования показали, что модули ТАС широко распространены и среди бактериальных хромосом, но их функция долгое время оставалась неизвестной [43]. Установлено, что эти системы принимают активное участие в образовании биопленок, а также участвуют в формировании у патогенных бактерий вирулентности и множественной устойчивости [11, 45, 46].

По типу генетической организации, характера антитоксина и механизма его взаимодействия с токсином в настоящее время выделены шесть типов модулей ТАС [35]. Во всех типах ТАС токсины представлены белками, тогда как антитоксины могут быть либо нетранслируемой антисмысловой РНК (I и III типы), либо лабильным белком (II, IV—VI типы) [29, 30, 25]. Наиболее охарактеризованными являются модули I и II типов.

Токсины I типа — это небольшие гидрофобные пептиды, которые вызывают потерю клеткой электрического мембранного потенциала и прекращение роста бактерий. Антитоксин подавляет активность белка токсина путем связывания мРНК [41].

Самыми распространенными и хорошо исследованными являются модули ТАС II типа. Токсины этого типа ингибируют репликацию клетки, подавляя активность ДНК-гиразы (ДНК-топоизомеразы II), но большинство из них функционируют как ингибиторы трансляции, обладая активностью эндорибонуклеазы (катализируют деградацию РНК) или инактивируя глутамил-тРНК-синтетазу (GltX) [17, 35, 41]. Антитоксины этого типа, являющиеся белками, блокируют токсин путем прямого связывания [17].

На ведущую роль ТАС II типа в формировании феномена персистенции указывает тот факт, что первый открытый ген устойчивости бактерий *hipA* впоследствии оказался ответственным за кодирование одноименного токсина в локусе *hipBA* ТАС II типа [22]. Кроме того, в клетках-персистерах модельных диких штаммов *E. coli* выявлена индукция сверхэкспрессии некоторых токсинов II типа: *relE* (генетический локус *relBE*) [41], *mazF* (локус *mazEF*) [17, 41], *dinJ* (локус *dinJ-yafQ*) и *mqsR* (локус *mqsQR*) [17].

В более поздних исследованиях на тех же моделях при антибиотикотерапии была выявлена аналогичная сверхэкспрессия токсинов ТАС I типа *tisB* (локус *tisB-istR*) и *hokB* (локус *hokB-sokB*), которая была связана с высокими уровнями гуанозин пентафосфата (ppGpp) — регулятора контроля скорости роста бактерий [15]. Эти токсины вызывали деполяризацию клеточной мембраны и резкое снижение метаболической активности, индукцию образования устойчивых клеток-персистеров [15, 30, 44].

Установлено, что в микробной клетке под действием токсинов подавляются ключевые клеточные процессы, такие как репликация ДНК и трансляция белка. Это ингибирование приводит к быстрой остановке роста и резкому снижению метаболической активности, формированию частичной или полной резистентности бактерий к антибиотикам, делает их устойчивыми к большинству антибактериальных средств [44].

Изучение функционирования комплексов ТАС позволило подтвердить гипотезу о физиологической неоднородности фракции клеток-персистеров в популяции и природу разной степени антибиотикорезистентности, а также помогло в выяснении механизмов формирования бактериальных покоящихся форм [8, 12, 24].

Возрастающее медицинское и эпидемиологическое значение сапронозных инфекций подтверждает актуальность изучения стратегий сохранения патогенного потенциала их возбудителей, а также способов их выживания в природных экосистемах в межэпидемический период.

Достижения современной клеточной биологии позволили существенно продвигнуться в изучении молекулярно-генетических механизмов регуляции выживаемости бактерий и сохранения ими патогенного потенциала в нестабильных условиях природных экосистем в периоды сапрофитической и паразитической фаз их существования.

Дормантные формы существования бактериальных клеток — жизнеспособные, но не культивируемые, L-формы, персистенция и недавно открытое контакт-зависимое ингибирование роста (contact-dependent growth inhibition, CDI) [39] — определяют многообразие адаптационных стратегий микроорганизмов и арсенал сложных молекулярно-генетических регуляторных механизмов. В то же время, устойчивые формы бактерий могут представлять серьезную эпидемиологическую угрозу, связанную с переоценкой полноты дезинфекции. При наступлении благоприятных условий дормантные формы бактерий способны вновь перейти в активное вегетативное состояние и дать начало новой популяции [16, 31, 47].

Определение ведущей роли ТАС в формировании устойчивых клеточных форм и развитии антибиотикорезистентности бактерий имеет не только фундаментальное значение, но и открывает широкие перспективы для разработки новых антимикробных технологий. Высокая скорость приобретения патогенными бактериями множественной лекарственной устойчивости определяет актуальность и необходимость этого направления исследований.

Учитывая отсутствие генетических модулей ТАС у млекопитающих, и в том числе у человека, новые технологические стратегии могут быть направлены на создание эффективных и высокоспецифических биохимических модуляторов токсин-анти-токсिनных взаимодействий. Тем не менее, одним из возможных недостатков эффективности этих антимикробных стратегий является высокая распространенность ТАС и в геноме нормальной микробиоты, находящейся в симбиозе с человеческим организмом, что потребует разработки препаратов, нацеленных на несколько систем, в том числе пробиотического действия.

Другая особенность этой терапевтической стратегии заключается в том, что недостаточно просто ингибировать антитоксины для активации токсинов, действие последних необходимо будет в дальнейшем блокировать другими препаратами [19, 31]. Однако стимулирование дальнейших фундаментальных исследований ТАС в патогенных бактериях может дать ценную информацию для создания будущих антибактериальных альтернатив.

Ряд перспективных антибактериальных стратегий связаны с АТФ-зависимой казеин-литической протеазой ClpP, важнейшим компонентом комплексов ClpXP и ClpAP бактерий [25, 50]. Одна из этих стратегий связана с активацией ClpP циклическим ацилдепептидом (ADEP-4, одной из шести конфигураций этого природного антибиотика) и вызывает неконтролируемую деградацию белка, ингибирование деления бактериальных клеток и последующую гибель как активно делящихся, так и клеток-персистеров грамположительной флоры. Эффективность ADEP-4 возрастает в сочетании с различными антибиотиками, такими как ципрофлоксацин, линезолид, ванкомицин или рифампицин [25, 50]. Другие исследователи предла-

гают иные пути, связанные с инактивацией ClpP [48, 50]. Эти стратегии являются перспективными для разработки на их основе новых форм лекарств.

Другие микробиологические биотехнологические подходы борьбы с устойчивыми клеточными формами связаны с механизмами «persister awakening» (пробуждение клеток-персистеров) [25, 26, 40]. В этих подходах используются соединения, для поступления в клетку которых не требуется активного транспорта, а процесс киллинга клеток-мишеней — каких-либо клеточных механизмов. Примерами таких биотехнологий, активных при сочетанных инфекциях, ассоциированных с *E. coli*, *S. aureus* и *P. aeruginosa*, являются использование ДНК-сшивающих противоопухолевых цитостатических препаратов, митомицина С [23] и цисплатина [14].

Таким образом, изучение механизмов и закономерностей регуляции образования устойчивых клеточных форм с целью предотвращения формирования персистенции и (или) выявление факторов, модулирующих скорость реверсии клеток от вегетативного активного состояния до некультивируемых клеточных форм, предполагает возможность повышения эффективности антибиотикотерапии, выявления молекулярных мишеней для создания новых антибактериальных препаратов и стратегий.

Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток», проект № 18-5-099.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов А.Б., Кузин А.А. Сапронозные инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: проблемные вопросы теории. Пермский медицин. журнал. 2017, 34(4): 94-102.
2. Белов А.Б., Куликалова Е.С. Сапронозы: экология возбудителей, эпидемиология, терминология и систематика. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 86(1): 5-16.
3. Брусина Е.Б. Эпидемиология инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных возбудителями группы сапронозов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015, 81(2): 50-56.
4. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология. Журн. микробиол. 2015, 4: 4-9.
5. Литвин В.Ю., Сомов Г.П., Пушкарева В.И. Сапронозы как природно-очаговые болезни. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 50(1): 10-16.
6. Сомов Г.П., Бузалева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: ОАО «Полиграфкомбинат», 2004.
7. Allison K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. Nature. 2011, 473: 216-220.
8. Amato S.M., Brynildsen M.P. Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress. Curr. Biol. 2015, 25(16): 2090-2098.
9. Ayrapetyan M., Williams T.C., Baxter R. et al. Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. Infect. Immun. 2015, 83(11): 4194-4203.
10. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. Appl. Environ. Microbiol. 2014, 80(8): 2478-2483.
11. Bamford R.A., Smith A., Metz J. et al. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. BMC Biol. 2017, 15(1): 121.
12. Barth V.C., Rodrigues B.B., Bonatto G.D. et al. Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One. 2013, 8(12): e84361.
13. Chen S., Thompson K.M., Francis M.S. Environmental Regulation of *Yersinia* Pathophysiology. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2016, 6: 25.
14. Chowdhury N., Wood T.L., Martinez-Vázquez M. et al. DNA-crosslinker cisplatin eradicates bacterial persister cells. Biotechnol. Bioeng. 2016, 113(9): 1984-1992.
15. Dörr T., Vulić M., Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. PLoS Biol. 2010, 8(2): e1000317.
16. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. Nat. Rev. Microbiol. 2017, 15(8): 453-464.

17. Ghafourian S., Raftari M., Sadeghifard N. et al. Toxin-antitoxin systems: classification, biological function and application in biotechnology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2014, 16(1): 9-14.
18. Hubálek Z., Rudolf I. *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. USA: Springer Science & Business Media B.V. 2011.
19. Jaén-Luchoro D., Aliaga-Lozano F., Gomila R.M. et al. First insights into a type II toxin-antitoxin system from the clinical isolate *Mycobacterium* sp. MHSD3, similar to epsilon/zeta systems. *PLoS One*. 2017, 12(12): e0189459.
20. Kim J.-S., Chowdhury N., Yamasaki R. et al. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environmental Microbiology*. 2018, 20(6): 2038-2048.
21. Kint C.I., Verstraeten N., Fauvart M. et al. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol.* 2012, 20(12): 577-585.
22. Korch S.B., Hill T.M. Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation. *J. Bacteriol.* 2006, 188(11): 3826-3836.
23. Kwan B.W., Chowdhury N., Wood T.K. Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C. *Environ. Microbiol.* 2015, 17(11): 4406-4414.
24. Levin B.R., Concepcion-Acevedo J., Udekwi K.I. Persistence: a copacetic and parsimonious hypothesis for the existence of non-inherited resistance to antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2014, 21: 18-21.
25. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013, 12(5): 371-387.
26. Lewis K., Shan Y. Persister Awakening, *Mol. Cell.* 2016, 63(1): 3-4.
27. Li L., Mendis N., Trigui H. et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2014, 5: 258.
28. Lleo M.M., Ghidini V., Tafi M.C. et al. Detecting the presence of bacterial DNA by PCR can be useful in diagnosing culture-negative cases of infection, especially in patients with suspected infection and antibiotic therapy. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014, 354(2): 153-160.
29. Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K. (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell.* 2013, 154(50): 1140-1150.
30. Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell.* 2014, 157(3): 539-548.
31. Maleki A., Ghafourian S., Pakzad I. et al. *mazE* Antitoxin of Toxin Antitoxin System and *fbpA* as Reliable Targets to Eradication of *Neisseria meningitidis*. *Curr. Pharm. Des.* 2017, 24(11): 1204-1210.
32. Michiels J.E., Van den Bergh B., Verstraeten N. et al. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resist. Updat.* 2016, 29: 76-89.
33. Nowakowska J., Oliver J.D. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013, 84: 213-222.
34. Orman M.A., Brynildsen M.P. Erratum: Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat. Commun.* 2016, 7: 10756.
35. Page R., Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* 2016, 12(4): 208-214.
36. Patra P., Klumpp S. Population Dynamics of Bacterial Persistence. *PLoS One*. 2013, 8(5): e62814.
37. Pienaar J.A., Singh A., Barnard T.G. The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review. *Afr. J. Lab. Med.* 2016, 5(1): 368.
38. Potgieter M., Bester J., Kell D.B. et al. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015, 39(4): 567-591.
39. Ruhe Z.C., Low D.A., Hayes C.S. Bacterial contact-dependent growth inhibition. *Trends Microbiol.* 2013, 21(5): 230-237.
40. Schottroff F., Fröhling A., Zunabovic-Pichler M. et al. Sublethal Injury and Viable but Non-culturable (VBNC) State in Microorganisms During Preservation of Food and Biological Materials by Non-Thermal Processes. *Front. Microbiol.* 2018, 9: 2773.
41. Thakur Z., Dharra R., Saini V. et al. Insights from the protein-protein interaction network analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems. *Bioinformation*. 2017, 13(11): 380-387.
42. Van den Bergh B., Michiels J.E., Fauvart M. et al. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2016, 14(7): 613-616.
43. Van Melderen L. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr. Opin. Microbiol.* 2010, 13(6): 781-785.

44. Verstraeten N., Knapen W.J., Fauvart M. et al. Membrane depolarization-triggered responsive diversification leads to antibiotic tolerance. *Microb. Cell.* 2015, 2(8): 299-301.
45. Wang X., Wood T.K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77(16): 5577-5583.
46. Wen Y., Behiels E., Devreese B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog. Dis.* 2014, 70(3): 240-249.
47. Wood T.K. Combatting bacterial persister cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2016, 113(3): 476-483.
48. Wood T.K. Strategies for combating persister cell and biofilm infections. *Microb. Biotechnol.* 2017, 10(5): 1054-1056.
49. Xiao X.L., Tian C., Yu Y.G. et al. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 using propidium monoazide treatments and qPCR. *Can. J. Microbiol.* 2013, 59: 157-163.
50. Zeiler E., List A., Alte F. et al. Structural and functional insights into caseinolytic proteases reveal an unprecedented regulation principle of their catalytic triad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013, 110(28): 11302-11307.

Поступила 25.02.19

Контактная информация: Андрюков Борис Георгиевич, д.м.н.,
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. (423)244-26-04