

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ И ИНФЕКЦИИ

В.В. Гостев, С.В. Сидоренко

Научно-исследовательский институт детских инфекций
ФМБА России, Санкт-Петербург

Bacterial biofilms and infections

V.V. Gostev, S.V. Sidorenko

Research Institute of Children Infections of FMBA of Russia, Saint-Petersburg

Резюме. В настоящее время общепризнано, что основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества, получившие название биопленок, а не отдельные планктонные клетки. Биопленки обнаруживают более чем в 80 % хронических инфекционных и воспалительных заболеваний, что позволило выдвинуть концепцию хронических болезней как болезней биопленок. Для обмена информацией в пределах биопленки между отдельными клетками одного и того же или разных видов бактерии используют секретируемые феромоны, например сигнальные молекулы системы quorum sensing. Координация различных видов активности бактериальных клеток в составе биопленок обеспечивает им значительные преимущества. В составе биопленок бактерии оказываются защищенными от действия факторов резистентности хозяина и антибактериальных препаратов. Одним из возможных механизмов повышения устойчивости бактерий к внешним воздействиям и антибактериальным препаратам является значительное увеличение в составе биопленок доли клеток-персистеров.

Ключевые слова: биопленки, инфекции, межклеточная коммуникация, клетки-персистеры, толерантность к антибиотикам.

Введение

На современном этапе в медицинской микробиологии происходят качественные изменения в осмыслении процессов, происходящих при хронических инфекциях. Исследования механизмов развития инфекционного процесса, включая образование персистирующих форм микроорганизмов, не могут не учитывать наличия особого биологического явления — формирования бактериальных биопленок.

Прокариоты в природе существуют в двух физиологических формах, которые реализуют различные стратегии выживания. Свободно живущие популяции микроорганизмов с интенсивным клеточным делением и развитыми системами ак-

Abstract. It is now a common perception that the vast majority of bacterial life in nature is found in surface-bound communities called biofilms rather than in isolated planktonic cells. Biofilms are implicated in more than 80 % of chronic inflammatory and infectious diseases. The biofilm model allows the reconceptualization of multiple chronic diseases as biofilm diseases. The biofilm bacterial community uses secreted pheromones (eg, quorum sensing molecules) and other molecules for cell-cell signaling, even between species. These coordinated activities during formation of biofilms render the bacterial community numerous benefits. Biofilms confer resistance to many antimicrobials, and protection against host defenses. One possible reason for the increased resistance to environmental stresses and antibacterials observed in biofilm cells appears to be the increase in the portion of persister cells within the biofilm.

Keywords: biofilms, infections, cell – to – cell communication, persister's cell, tolerance to antimicrobial agents.

тивной и пассивной подвижности, быстро распространяющиеся в среде, относятся к планктонным формам. «Оседлые», сессильные формы (sessile cell) имеют выраженные механизмы специфической адгезии, они характеризуются медленной скоростью роста популяций и способностью агрегироваться в клеточные консорциумы. Популяции сессильных клеток формируют биопленки — сообщества клеток, адгезированных на субстрате, со сложной системой регуляции физиологических процессов, основанной на межклеточной коммуникации [13].

Впервые биопленки были обнаружены в природных экосистемах. Общая теория их формирования и развития сформулированы в работах

Costerton [13,14]. На сегодняшний день предполагается, что 90% изученных видов таксономического домена *Bacteria* способны формировать биопленки [3, 13, 24]. Таким образом, явление образования сложных консорциумов прокариотами универсально в природе. Роль биопленок в инфекционной патологии была оценена практически сразу же после их обнаружения, когда было установлено, что sessильные формы бактерий малочувствительны к факторам неспецифического и специфического иммунитета, а также к действию антибактериальных препаратов [16].

С конца прошлого столетия в медицине в многочисленных исследованиях стали появляться сообщения о способности бактерий образовывать пленчатые макроструктуры на поверхностях различных медицинских имплантатов и катетеров [28, 48, 16, 50]. Микроорганизмы, которые образовывали такие структуры, отличались повышенной выживаемостью [24]. В настоящее время известно, что бактерии способны колонизировать и формировать биопленки на любых медицинских имплантатах, катетерах, эндотрахеальных трубках и т.д. Это серьезная проблема в медицинской практике, поскольку в хирургических и реанимационных отделениях клиник широко используются различные инвазивные материалы. Образование биопленок при этом ведет к возникновению тяжелых катетер-, вентилятор-ассоциированных инфекционных осложнений, сепсисов. Другая немаловажная проблема — образование биопленок при самых разных инфекционных процессах. До 60% инфекций (инфекции дыхательных и мочевыводящих путей, остеомиелиты, эндокардиты, инфекционные осложнения при муковисцидозе,

и др.) вызваны sessильными формами бактерий [6, 34, 54]. Формирование биопленок в очаге воспаления ведет к хронизации инфекционного процесса и сопровождается неудовлетворительными результатами антибиотикотерапии.

Наиболее актуальными видами бактерий, образующих биопленки при инфекциях, являются стафилококки, представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. Способность образовывать биопленки была обнаружена и у микоплазм различных видов [42], но детали этого процесса до конца остаются не изученными в связи с особой биологией данной группы микроорганизмов [21, 59–61]. Непатогенные бактерии, комменсалы человека, существуют также в виде сложных мультивидовых сообществ, образуя микроценозы кожи, кишечника, слизистых [24]. Проблема взаимодействия биопленок нормальной микрофлоры человека с иммунной системой интенсивно изучается и дискутируется [13, 18].

Формирование биопленок

Образование биопленок — это сложный комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов: адгезии клеток на поверхности и перераспределения клеточной массы; активного деления клеток для создания клеточных кластеров; образования экзополимерного слизистого матрикса (рис. 1). Изначальное прикрепление микробной клетки к поверхности субстрата осуществляется за счет действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван дер Ваальса, неспецифической адгезии [3]. По результатам опытов *in vitro* установлено, что степень адгезии с последующим формиро-

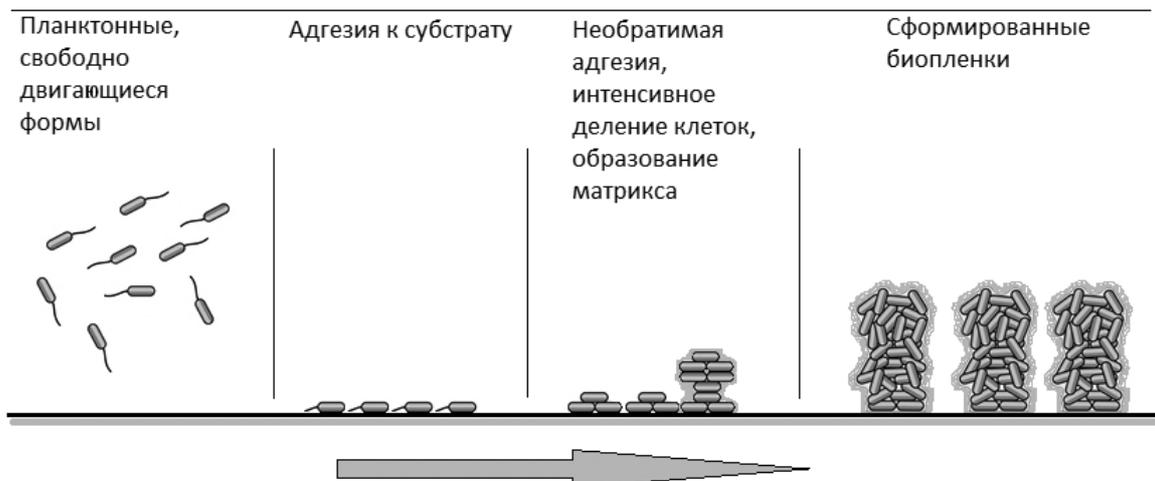


Рис. 1. Схема процесса формирования бактериальных биопленок

ванием биопленок наиболее выражена к таким материалам, как латекс, силикон, поливинилхлорид. Адгезия к тефлону, полиуретану, нержавеющей стали и титану проявляется в меньшей степени [16]. Все вышеперечисленные материалы широко применяются в медицинской практике, что является дополнительным риском появления биопленок.

Адгезия к биологическим поверхностям (к клеткам тканей, стенкам сосудов) обуславливается специфическим взаимодействием белков-адгезинов или лектинов фимбрий экзоплазматического компартмента бактериальной клетки с рецепторами или определенными доменами поверхности мембран хозяйских клеток. Рассмотрим некоторые примеры механизмов прикрепления у грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Важнейшим элементом в процессе адгезии стафилококков является (Polysaccharide Intercellular Adhesin) (PIA) – полисахарид, который участвует как в клеточной субстратной адгезии, так и в последующем формировании клеточных кластеров (клеточно-клеточная адгезия). PIA инициирует гемагглютинацию и препятствует фагоцитозу за счет активации бактериальной агрегации [70, 71]. Еще один изученный компонент экзоплазматического компартмента это α -токсин стафилококков, кодируемый геном *hla*. Этот токсин, помимо основной своей функции – образования поровых каналов в мембранах клеток эукариот (один из факторов вирулентности), – обладает еще и свойствами адгезина [3]. Мутанты с нарушенным биогенезом α -токсина и / или PIA не способны формировать полноценные биопленки [23, 76]. Также на первых стадиях формирования биопленок стафилококков значительную роль играют ВАР-белки (biofilm associated protein), тейхоевые кислоты, п-ацетилглюкозамин [66, 67]. За процессы адгезии, синтеза PIA и прочих структурных компонентов матрикса биопленок отвечает *ica*-оперон, находящийся в сложной системе генетической регуляции, охватывающей также экспрессию факторов вирулентности [9, 19, 39, 51]. *icaADBC*-локус обнаружен у многих видов стафилококков, а также среди некоторых других грамположительных микроорганизмов [12, 52, 62]. Все вышеуказанные синтезируемые компоненты специфически взаимодействуют с субстратами, они осуществляют якорную функцию и инициируют дальнейшие процессы образования биопленки.

У грамотрицательных микроорганизмов важную роль в адгезии и клеточной агрегации играют жгутики и фимбрии IV типа. Движение, обусловленное жгутиками, способствует распространению и образованию клеточного монослоя на субстрате, а фимбрии IV типа участвуют в клеточной агрегации за счет лектинового взаимодействия [6]. Обнаруже-

но, что в начальные фазы образования биопленок, у *P.aeruginosa*, активируются *crc*-гены, ответственные за биосинтез фимбрий [40, 47]. Также экспрессируется ген *pilA*, кодирующий белок пилин, являющийся структурной единицей фимбрий [34]. В опытах с *P.aeruginosa* было показано, что мутантные штаммы по генам, участвующим в биогенезе жгутиков и фимбрий IV типа, не способны в полной мере формировать биопленки [54].

Применение лазерной конфокальной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии, позволило установить, что биопленки имеют сложную трехмерную структурную организацию. После необратимой адгезии популяция микроорганизма начинает интенсивно пролиферировать с образованием многоклеточных слоев и обильно синтезировать компоненты экзополимерного матрикса, это один из ключевых моментов образования биопленок [41]. Поскольку плотность популяции увеличивается, в регуляцию формирования биопленки вступают «социальные» механизмы, которые будут описаны ниже. В химическом отношении матрикс неоднороден и различается у разных таксонов [3, 46, 47, 74]. В целом же экстрацеллюлярный слой содержит полисахариды (декстран, гиалуроновую кислоту, целлюлозу и другие), эта фракция наиболее выражена и составляет порядка 40 – 95% [53, 65]. Концентрация других химических компонентов очень сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов до 40% и нуклеиновых кислот 1 – 20% [3, 13]. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, так как 80 – 90% объема биопленки занимает вода. Экстрацеллюлярная ДНК участвует в адгезивных процессах и межклеточных взаимодействиях, но до конца роль нуклеиновых кислот в матриксе не выяснена [3, 17]. *P.aeruginosa* в биопленках обильно синтезирует альгинат (кодирующий генный кластер – *algACD*), штаммы со сверхэкспрессией гена *algA* обычно образуют слизистые колонии с выраженными свойствами вирулентности [49]. Альгинат химически связывает аминокликозиды за счет инактивации гидрофильных и положительно заряженных групп в молекуле [31, 47, 74]. Матрикс биопленки способен препятствовать скорости диффузии некоторых антибиотиков и других биоцидных препаратов, это зависит от его биохимического состава и метаболической активности популяции. Например, аминокликозиды как отмечалось, достаточно длительно диффундируют через матрикс, фторхинолоны, напротив, легко проникают через этот барьер [3, 20, 38]. Вообще проблема повышенной резистентности биопленок к действию антимикробных препаратов заключается в нескольких аспектах. Это вышеуказанный диффузионный барьер; способность бактерий накапливать в матриксе внеклеточные ферменты,

разрушающие антибиотики; агрегационная природа биопленок, связанная с уменьшением площади открытой поверхности клеток — физическая недоступность молекул; и, собственно, резистентный фенотип клеток. Сниженный метаболизм микроорганизмов в биопленке ведет к появлению антибиотикотолерантности, о чем будет сказано далее [27, 30, 38].

Клетки в слизистом матриксе располагаются не хаотически, а определенным образом. Структура многоклеточных кластеров представлена в виде грибоподобных, столбоподобных образований, «цементированных» в экзополисахаридный слой, что позволяет задерживать и поддерживать концентрацию питательных веществ, необходимых для роста популяции, а также служит защитой клеток от дегидратации, гуморальных и клеточных факторов резистентности макроорганизма [18, 74].

Матрикс разделен каналами, наполненными водой, а также имеет полости и пустоты. Через каналы транспортируются питательные вещества и проходят конвективные потоки кислорода от внешних к внутренним частям биопленки, одновременно с этим выводятся метаболиты бактериальных клеток [47]. Клетки бактерий в биопленке имеют сложную полиморфную организацию с определенной цитоархитектоникой (выявляются клетки с сильно измененной морфологией, мертвые клетки, различные удлинённые типы у кокковых форм и т.д.) [3, 16, 29].

Многослойная топография влияет на метаболизм и физиологическую активность клеток. Периферические слои более аэрированы по сравнению с центральными частями, где образуется анаэробная микрониза [26]. Используя микроэлектроды, удалось установить, что на глубине около 30 мкм от поверхности биопленки концентрация кислорода резко снижается [55]. В связи с этим немалый интерес представляют изменения метаболического фенотипа в глубинных слоях биопленки. Хорошо изучен процесс переключения метаболизма с аэробного дыхания на нитратное дыхание у изолятов *P.aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом [26, 54]. Такое переключение метаболизма обусловлено заменой конечного акцептора кислорода дыхательной цепи на молекулы нитратов и нитритов. В связи с этим в клетке происходит регуляторная перестройка экспрессии генов, и начинается синтез специфических для нитратного дыхания ферментов: Nap — периплазматической нитратредуктазы, NarGHI, NarZYV — мембранно-связанных нитратредуктаз и других [2, 26, 69]. Ключевая роль в переключении аэробного метаболизма на анаэробный принадлежит регулятору транскрипции Fnr-белку, реагирующему на изменения концентрации молекулярного кислоро-

да [69]. Анаэробные субпопуляции биопленок синегнойной палочки обладают более выраженной устойчивостью к факторам окружающей среды, а также приобретают устойчивость к действию антимикробных препаратов [26].

Колебания кислорода, уровня кислотности, параллельно с колебаниями концентраций питательных веществ, метаболитов клеток, обуславливают, следовательно, образование разнородных областей в биопленках [3]. Адаптируясь к таким гетерогенным микронизам, бактерии в биопленке образуют множество фенотипов с широкими метаболическими и репликативными свойствами. Такое сообщество (популяция) обладает громадными способностями к сопротивлению стрессовым факторам [13, 47].

Строение биопленок идеально способствует процессам обмена генетической информацией за счет тесного контакта и стабильной пространственной локализацией клеток. Исследования *in vitro* показывают, что уровень конъюгации в биопленках гораздо выше, по сравнению с планктонными формами бактерий [31]. Более того, процессы конъюгации могут регулироваться на популяционном уровне за счет бактериальной коммуникации, например вирулентные энтерококки для передачи генетической информации используют сигнальные системы [46].

Биопленки с дифференцированными клетками бактерий, с гетерогенными микронизами и водными каналами, представляющими примитивную циркуляторную систему, напоминают организацию высших организмов, у которых совокупность дифференцированных тканей образует сложный многоклеточный организм.

Quorum sensing. Формирование, рост, миграция планктонных форм клеток для колонизации в биопленках регулируются на уровне популяции посредством механизмов межклеточной коммуникации. «Quorum sensing» (QS) — это процесс коллективной координации экспрессии генов в популяции бактерий, опосредующий специфическое поведение клеток. Впервые явление межклеточной коммуникации было обнаружено и описано у симбиотической морской бактерии *Vibrio fischeri* [43, 73]. Эти бактерии колонизируют специализированный орган моллюсков, ответственный за биолюминесценцию. В опытах *in vitro* установлено, что популяция, достигая определенной численной плотности, начинает проявлять эффект люминесценции [43]. Механизм работы QS основан на сложной иерархической регуляции целевых локусов генома бактериальной клетки. При этом регуляция осуществляется на разных уровнях воздействия: транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном. На конкретный клеточный

сигнал клетки в популяции отвечают специфическим ответом. На сегодняшний день установлено, что клеточно-клеточные взаимосвязи влияют на внутривидовую дифференцировку клеток, на экспрессию генов вирулентности, регулируют ростовые процессы, характер и направление подвижности (таксис), а также бактериальный апоптоз и токсинообразование [73].

Работу QS можно сравнить с гормональной регуляцией функциональной активности различных органов и тканей в многоклеточном организме. Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы используют различные сигнальные системы и разные химические передатчики сигналов. Первые синтезируют 7–8-членные пептиды (*Enterococcus spp.*), циклопептиды (*Staphylococcus spp.*); вторые: разнообразные ацил-гомосерин лактоны (AHL) [3, 64].

Рассмотрим работу QS на примере синегнойной палочки. У данного микроорганизма функционируют, по меньшей мере, три регуляторные системы, схема представлена на рисунке 2. Наиболее изученная из них LasI – LasR система (в качестве химического сигнала выступают AHL с длинной ацильной цепью); RhlI – RhlR система (мессенджер – AHL с короткой ацильной цепью, C4-HSL); и хинолоновая PQS система [4]. Взаимодействие этих трех систем позволяет регулировать экспрессию порядка 6–10% генома [57]. В LasI – LasR системе за биосинтез сигнальных молекул отвечает AHL-синтаза, продукт гена *lasI*. Его экспрессия находится на базальном уровне, поэтому накопление сигнальных молекул происходит достаточно длительно, и биологический эффект начинает проявляться только в стационарной фазе роста популяции [43, 44, 73]. В клетках AHL взаимодействует с LasR-белком (продукт *lasR*-гена, экспрессия которого также находится на базальном уровне), образуя при этом гомодимер – регулятор транскрипции. Этот регулятор активирует множество генов, участвующих в формировании вирулентности, и в процессах образования биопленок, он также активирует хромосомный регулон *las* *Vox*, который отвечает за экспрессию различных факторов патогенности (протеазы, эластаза, и прочее).

Комплекс LasR + AHL активирует вторую сигнальную систему. Это происходит после взаимодействия с промотором *Rhl*-генов. Экспрессия *RhlI* обуславливает образование протеина для синтеза AHL с короткими ацильными остатками (C4-HSL). Ген *rhlR* кодирует белок (RhlR), который взаимодействует с сигнальными молекулами C4-HSL. Образующийся протеиновый тандем RhlR + C4-HSL регулирует транскрипцию генов, кодирующих различные структурные соединения матрикса биопленок (альгината, рамнолипида и др.), а также липазы, пиоцианина. Также этот транскрипцион-

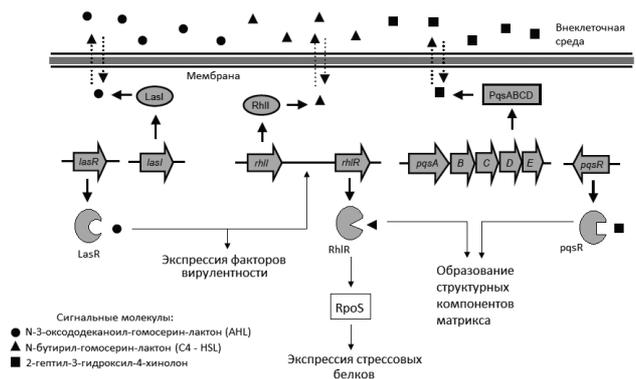


Рис. 2. Схема «Quorum sensing» у *P.aeruginosa*, представлены три сигнальные системы (пояснения в тексте)

ный регулятор активирует экспрессию другого регулятора – RpoS (сигма-фактор стационарной фазы роста *P.aeruginosa*), который инициирует образование стрессовых белков клетки и участвует в адапционных реакциях [3, 10, 13, 73]. Среди клинических изолятов *P.aeruginosa* обнаружено, что помимо функционирования AHL-сигнальных систем, параллельно вступает хинолоновая система (генный локус – *pqsABCDE*), мессенджерами являются гидрокси-алкилхинолоны и гидрокси-гептилхинолоны [5, 15, 73]. Эта система функционирует так же, как и вышеописанные механизмы регуляции, и опосредует увеличение экспрессии факторов вирулентности, в частности, синтез эластазы, лектинов. Взаимодействие трех сигнальных систем затрагивает большое количество генов, в связи с чем происходит глобальная регуляция транскрипции, что приводит к очень гибкой лабильности физиологических процессов клетки, и является следствием огромного адапционного потенциала бактерий в популяции.

QS регулирует важный процесс переключения фенотипа бактериальной клетки с планктонной формы на sessильную. Это необходимый этап в образовании биопленки для биологически выгодного паразитирования макроорганизма. В самом начале инфекционного процесса первостепенной целью патогена является проникновение и адгезия в тканях макроорганизма, при этом, как отмечалось выше, ресурсы клетки направлены на биосинтез жгутиков и специфических белков – адгезинов. Однако компоненты фимбрий и жгутиков, белки адгезинов являются сильными иммуногенами, они стимулируют также образование интерлейкинов. Соответственно для дальнейшего выживания популяции внутри инфекционного очага образование жгутиков и систем адгезии будут биологически не выгодными. Поэтому на этапе созревания биопленки QS ингибирует образование жгутиков и адгезинов. Аналогичным образом происходит об-

ратный процесс — образование подвижных форм клеток в биопленке или высвобождение целого кластера клеток (detachment cell) для колонизации окружающего субстрата. Подобный процесс переключения фенотипа, регулируемый QS, остается до конца не изученным [13, 35, 44].

Сигнальные системы работают по принципу аутоиндукции, синтезированные сигнальные молекулы действуют на свою же клетку, и по мере их накопления во внеклеточной среде происходит все большая активация зависимых промоторов, регулонов генома клеток. QS на основе AHL обнаружен у многих грамотрицательных бактерий: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Chromobacterium*, *Hafnia*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia* и др. [44]. AHL-коммуникация осуществляется внутри вида, специфичность и сила биологического ответа зависит от химической структуры самой сигнальной молекулы [44, 73]. Но среди клинических изолятов грамотрицательных бактерий часто наблюдается и перекрестная коммуникация (cross — talk communication), обеспечивающая взаимодействие популяций разных видов в инфекционном очаге [3, 73]. Перекрестный QS способен как активировать, так и ингибировать работу зависимых целевых генов в бактериальных ассоциациях [15]. Например, *P. aeruginosa*, *Serratia liquefaciens*, *Aeromonas hydrophila* синтезируют один тип сигнальных молекул. QS *C.violaceum* и *A.hydrophila* ингибируется AHL-молекулами с длинными ацильными остатками, которые синтезируются различными грамотрицательными микроорганизмами [57]. Синегнойная палочка образует сигнальные молекулы с длинными и короткими ацильными остатками, и они взаимно не ингибируются, однако, мессенджеры *E.coli* такой же молекулярной структуры с длинными ацильными остатками способны ингибировать rhl-сигнальную систему *P.aeruginosa*. В смешанных биопленках *P.aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*, буркхолдерии реагируют на сигналы синегнойной палочки (которая в свою очередь не чувствительна к сигналам *B.cepacia*), следовательно, популяция *P.aeruginosa* регулирует многие физиологические процессы своего ассоцианта [15, 73]. Имеются данные, что некоторые штаммы *P.aeruginosa*, выделенные от больных исцидозом, не способны сами синтезировать аутоиндукторы rhl-сигнальной системы, следствием чего является снижение вирулентности, и неполноценное формирование биопленок в опытах *in vitro*. Но, однако, *in vivo*, эти же штаммы синегнойной палочки формируют полноценные биопленки. Выяснено, что микрофлора, выделенная из слизи от тех же больных, синтезирует rhl-аутоиндукторы, регулируя таким образом вирулентность и фор-

мирование биопленок *P.aeruginosa* и инициируя инфекционный процесс [15]. Сами AHL-молекулы неодинаково влияют на другие группы бактерий, установлено например, что аутоиндукторы синегнойной палочки блокируют работу QS у *S.aureus* [3]. Сигнальные молекулы прокариот способны влиять и на поведение клеток грибов, растений, и даже животных клеток. Так, AHL *P.aeruginosa* подавляет процесс филаментации *Candida albicans*. В организме человека AHL-молекулы ингибируют пролиферацию лейкоцитов и процесс образования фактора некроза опухолей α . В высоких концентрациях AHL инициируют апоптоз разных типов иммунокомпетентных клеток [15, 44]. В целом, бактериальные аутоиндукторы оказывают иммуносупрессирующее действие.

Именно за счет реакций QS осуществляются «социальные» отношения внутри популяции, образуется «химическая коммуникационная сеть» биопленки, которая может охватывать мультитовидное сообщество.

Не менее интересна работа сигнальных систем среди грамположительных микроорганизмов. Например, у *Enterococcus spp.* QS регулирует процесс переноса плазмид (от донорной к реципиентной клетке) через механизм конъюгации [46]. Клетка-реципиент синтезирует специфический пептидный сигнал («половой» бактериальный феромон) который накапливается в среде и специфически связывается с рецепторами клеток-доноров, несущими плазмиду, которая соответствует этому феромону. Запускаемая при этом регуляторная система обеспечивает экспрессию факторов, опосредующих клеточное взаимодействие и перенос плазмиды (компоненты конъюгации). Как отмечалось выше, определенной плазмиде соответствует конкретный феромон. За счет такого строгого механизма взаимодействия осуществляется бактериальная селекция клеток внутри биопленки [64]. Посредством такой коммуникации транслоцируются плазмиды, несущие гены устойчивости к антибиотикам, гены гемолизина, бактериоцинов. Обычно биологически активные сигнальные пептиды закодированы в хромосоме, а рецепторные белки, обеспечивающие аффинитет к феромонам закодированы в самих плазмидах [3]. После транслокации плазмиды в клетку реципиента, она начинает синтез ингибиторов феромонов, для каждого типа феромона соответствует свой ингибитор. Это свойство позволяет выключать сигнал для уже имеющейся плазмиды, и усиливать накопление молекул феромонов для другого типа плазмид [43]. За счет работы подобной системы в популяции биопленки постоянно происходит положительная селекция штаммов с выгодными свойствами и отрицательная селекция — элиминация штаммов, с «ненужными» фенотипами. При инфекционных

поражениях такие коммуникативные механизмы передачи мобильных генетических элементов позволяют с максимальной скоростью распространять гены антибиотикорезистентности, вирулентности, дополнительные физиологические возможности [64].

Наибольший интерес представляет QS, участвующий в регуляции экспрессии факторов вирулентности у стафилококков. Генетической основой работы этой системы является *agrABCD* – хромосомный локус [68]. В качестве передатчиков сигналов выступают циклопептиды – аутоиндукторы (AIP, auto-inducing peptide), которые классифицированы по строению и биологическому эффекту на группы и субгруппы, например, 1 и 4 субгруппы у *S. aureus* увеличивают экспрессию факторов вирулентности [3]. Эти молекулы крайне специфичны, замена хотя бы одной аминокислоты в структуре соединения, ведет к потере биологической функции. Как и с примерами сигнальной – ингибиторной системы у энтерококков, стафилококковая система реагирует только на один тип аутоиндукторов, как только клетка получила специфический сигнал, активируются гены-ингибиторы, и клетка уже не способна воспринимать другие сигналы. Такой механизм обеспечивает жесткую популяционную селекцию. Синтезированные сигнальные молекулы взаимодействуют с гистидинкиназной мембранной системой (*agrC*), которая через каскад реакций активирует регулятор транскрипции (*agrA*). Этот белок осуществляет бифункциональную регуляцию двух промоторов P2 и P3. Соответственно, транскриптами этих зависимых генов является РНК II и РНК III, первая содержит основные *agr*-гены, таким образом проявляется аутоиндуктивный ответ системы [7, 8, 11]. В свою очередь РНК III обеспечивает регуляцию синтеза факторов вирулентности (ДНКазы, фибринолизина, энтеротоксина, α -, β -, δ -токсинов и др.). Интересной особенностью на данном этапе регуляции является то, что транскрипт РНК III размером в 500 пар нуклеотидов не несет кодируемой информации, за исключением одной открытой рамки считывания для δ -токсина. Подавляющая часть молекулы транскрипта сама выступает как рибосомальный ингибитор. РНК III блокирует процесс трансляции фактора репрессии вирулентности Rot (repressor of toxins), регулирующий синтез стафилококковых токсинов [22, 68, 72], следствием чего является неконтролируемое образование экзотоксинов. Таким образом, *agr*-система обеспечивает популяционную регуляцию экспрессии факторов вирулентности стафилококков [7]. Используя различные варианты ПЦР-исследований, установлено, что экспрессия *agr*-локуса в клетках наблюдается при многих стафилококковых поражениях: инфекции кожи, эндокардиты, артриты, сепсис [22, 23].

В популяции биопленок накапливаются сигнальные молекулы, синтезируемые подавляющим большинством клеток, являющихся метаболическим и генетическим «ядром, кворумом» популяции, они задают метаболическое поведение, фенотипические изменения для всех клеток. Это осуществляется за счет аккумуляции сигналов через свойство аутоиндукции, и ингибирование других сигналов, синтезируемыми меньшинством, либо вообще иными штаммами в биопленке за счет параллельного механизма ингибирования.

Персистеры

В 1944 году Джозеф Биггер, врач из Университета в Дублине, проводил опыты, изучая воздействие пенициллина на стафилококки. При этом он выращивал клетки в питательном бульоне, а затем воздействовал антибиотиком. Подавляющая часть культуры погибала, но оставались единичные клетки, которые потом при повторном выращивании восстанавливали прежнюю популяцию. Тогда он предположил, что в культуре бактерий сохраняется небольшая часть клеток, которые проявляют устойчивость к пенициллину, несмотря на то, что вся популяция чувствительна к его действию [13]. Его результаты не были замечены в то время из-за бурного введения в медицинскую практику пенициллина. Позже, повторяя опыты Биггера, исследователи пришли к выводу, что подобное выживание клеток является следствием мутаций, возникающих под воздействием больших концентраций антибиотиков. Однако это не так. Детальное изучение биологии, генетики выживающих единичных клеток после воздействия антимикробных препаратов позволило открыть особый субфенотип популяций-персистеров (*persister's cell*). Персистеры это альтруистические клетки, которые образуются в стационарной фазе роста, они метаболически не активны и обеспечивают выживание материнской популяции в присутствии летальных, для всех клеток, факторов [3, 33]. В биопленках эта субпопуляция составляет 1 – 5% от всей клеточной массы [1]. Формирование таких клеток зависит от степени роста популяции, в лог-фазе культура не образует или образует очень небольшую долю персистеров, их количество увеличивается к стационарной фазе. Образование субпопуляции обратно зависимо от уровня метаболической активности всех клеток биопленки, а также от действия экзогенных неблагоприятных факторов. Фенотип персистеров характеризуется интересной биологией, они замедляют все физиологические процессы и становятся толерантными к действию разных факторов, в том числе и к воздействию антимикробных препаратов [1, 32]. Свойство антибиотикотолерантности отличается от механизмов резистентности [56]. Действие

всех механизмов устойчивости бактерий, по существу, можно свести к одному явлению — это предотвращение взаимодействия антибиотика с его мишенью (за счет изменений самих мишеней, или с помощью синтеза ферментов, нейтрализующих антибиотики). Толерантность же опосредуется способностью микробной клетки выживать в присутствии антибиотика за счет замедления метаболизма и «выключения» основных биологических процессов клетки. Антибиотики эффективно проявляют свое действие в отношении интенсивно делящихся клеток с высоким уровнем синтетических процессов. А когда клетка находится в стадии физиологического покоя («клеточного анабиоза»), антибактериальное средство не способно проявить в полной мере свою биохимическую функцию. Например, эритромицин ингибирует биосинтез белка, этим проявляется его бактериостатический эффект (клетка не растет, не размножается, метаболизм замедляется). Но клетка не погибает непосредственно от действия препарата. Стрептомицин, аминогликозиды, фторхинолоны нарушают процессы трансляции, репликации. «Выключая» на время работу рибосом, клетка-персистер будет проявлять толерантность к аминогликозидам, макролидам. Так как персистеры не растут, не делятся, хромосома и белковые системы репликации, репарации, транскрипции находятся в интактном состоянии, то действие фторхинолонов не проявится. Следствием вышеуказанных «выключений» биологических функций клетки является и прекращение синтеза пептидогликана, останавливается построение клеточной стенки, в связи с этим, β -лактамы также будут не эффективны. Белки персистеров выключают работу, функцию всех мишеней антибиотиков, опосредуя тем самым мульти толерантность (MDT, multi-drug tolerance). Следовательно, бактерицидные антибиотики в отношении персистеров будут оказывать только бактериостатический эффект [3, 32, 45, 75].

Каким образом происходит перестройка клеточной физиологии у персистеров? Это сложный, до конца не изученный процесс, в который вовлечено множество генетических систем клетки. Важнейшую роль здесь играют хромосомные ТА-модули (toxin — antitoxin). Это генетические системы, которые позволяют переживать бактериям крайне экстремальные условия среды через состояние метаболического покоя. ТА-модули экспрессируют клеточные токсины и антитоксины, которые находятся в цитоплазме в связанном состоянии. Но после длительного экзогенного воздействия негативных факторов происходит интенсивная экспрессия цитотоксинов, которые блокируют процессы трансляции. Токсин будет проявлять свою функцию до тех пор, пока клетка не окажется в благоприятных усло-

виях, что является сигналом для активации генов антитоксина. Следствием этого является связывание токсина в протеиновый комплекс и нормализация метаболических процессов клетки. Сами токсины способны оказывать разностороннее цитотоксическое действие на различные звенья метаболизма клетки, это зависит от типа ТА-модуля. Например, у *E.coli* описано 15 хромосомных ТА-модулей, у *Mycobacterium tuberculosis* около 80. [25, 33, 36]. Наиболее изученный ТА-модуль *E.coli* — это хромосомный локус *hip* (high persistence), установлено, что бактериальные популяции, несущие этот локус, способны формировать в 100 — 1000 раз больше персистеров, чем популяции, не несущие эти гены [58, 75]. Используя методику генных чипов, на примере биопленок кишечной палочки, показано, что персистеры в первые минуты воздействия антибиотиками активируют множество генов [25, 45, 63]. И среди них локусы ТА-модулей: *RelBE*, *MazEF*-системы и их гомологи, функциональное значение этих локусов — инициация программируемой клеточной гибели бактерий и «выключение» работы рибосом. Клеточные токсины указанных систем блокируют важные клеточные функции, такие как трансляция, репликация. Соотношение в клетках-персистерах образуемых клеточных токсинов / антитоксинов опосредуется влиянием неблагоприятных внешних факторов. Наличие такого биологического механизма позволяет патогенным бактериям длительно выживать в инфекционном очаге. В исследованиях К. Lewis, с соавторами [36, 37] описано, что клетки, экспрессирующие *RelE*, становились толерантными к действию офлоксацина, цефотаксима, тобрамицина, в отличие от клеток, которые не запускали *RelE*-модули. В формировании персистентного фенотипа, помимо ТА-модулей, задействованы и другие гены, например гены SOS-систем. Они кодируют белки фагового, теплового, холодового шока (*sulA*, *cspH*, *htrA*, *ibpAB*, *htpX*, *clpB*, *psp*, *umuDC* и прочие). Экспрессия стресс-ассоциированных факторов связана с функцией выживания персистеров, но продукты этих генов способны также ингибировать трансляцию, репликацию (*umuDC*), разделение клеток во время деления (*sulA*). Однако это еще не все физиологические возможности персистеров. Кластерный анализ результатов, полученных при использовании генных чипов, показал, что помимо гиперэкспрессии вышеописанных генов, происходит противоположный процесс — снижение экспрессии других генных локусов. Среди них гены, участвующие в биосинтезе компонентов жгутиков, опероны, вовлеченные в окислительное фосфорилирование НАДН-дегидрогеназы, АТФ-синтазы, цитохром-О-убихинол оксидазы и других. Это основные ферментативные системы, принимающие участие в базовых процессах ассимиляции — диссимиляции клетки. Следовательно, происходит «выключение» метаболизма,

приводящее к состоянию клеточного покоя (рис. 3). Работа генетических TA-модулей, обуславливающих выключение биологически важных функций остается до конца не изученной, как и физиология и прочие механизмы выживания клеток-персистеров. На сегодняшний день проводятся исследования по поиску генов, задействованных в процессах образования покоящихся форм клеток, в частности, недавно были описаны белки YgfA и YigB, которые блокируют синтез нуклеотидов и флавиномононуклеотидов, возможно, они также участвуют в механизмах формирования персистеров [32, 33, 36, 37].

Все факторы иммунной защиты способствуют элиминации бактериальных клеток вне биопленок (планктонных форм), но антитела, белки компле-

мента и фагоцитирующие клетки не способны проникать через экзополисахаридный слой. Антибиотики способны проникать сквозь этот барьер и уничтожать микроорганизмы внутри самой биопленки с различным успехом. Но выжившие клетки персистеры с их толерантностью и громадной способностью к выживанию остаются интактными. После прекращения антибиотикотерапии, через некоторое время начинается синтез и накопление в клетках персистеров антитоксинов, цитотоксины нейтрализуются, активируются все биологические процессы. После прекращения действия цитотоксинов клетки начинают пролиферировать, возобновляется бактериальная коммуникация и таким образом восстанавливается материнская

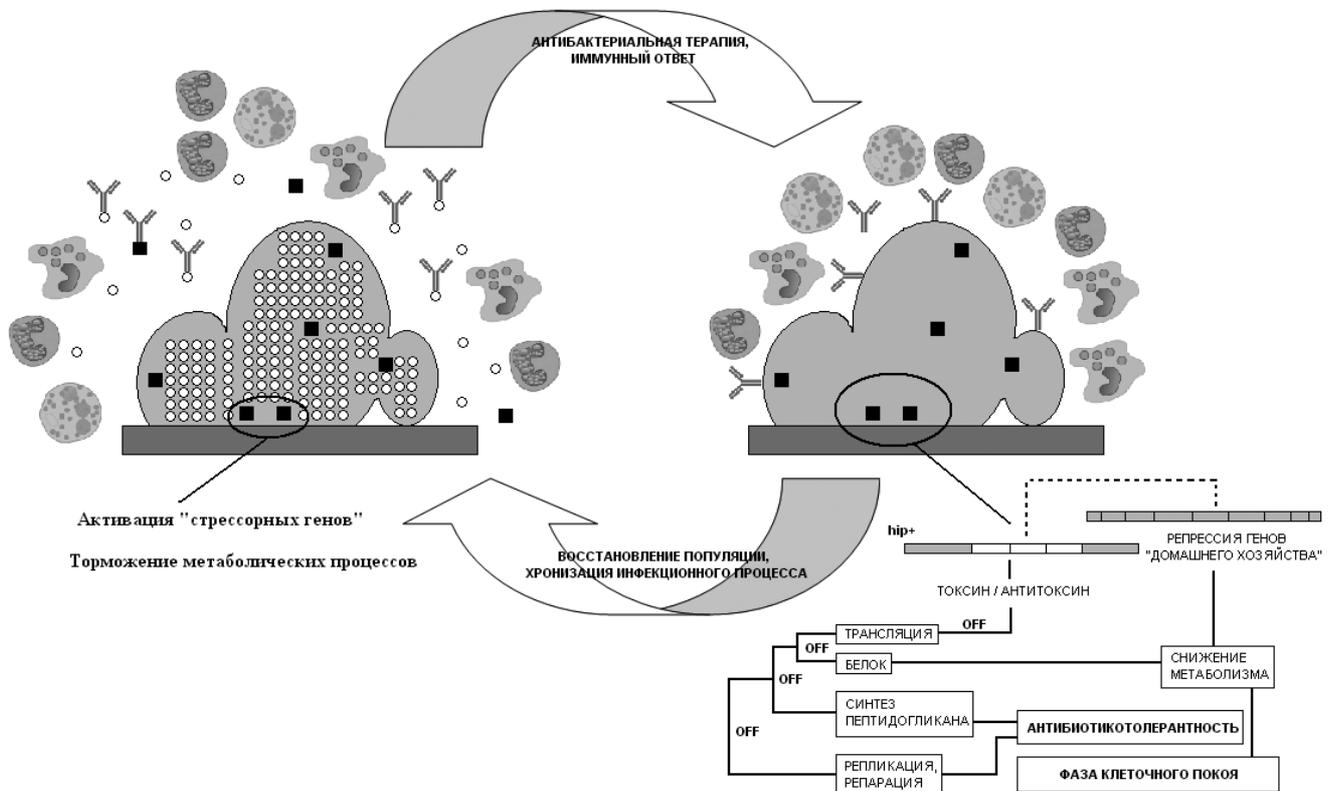


Рис. 3. Модель воздействия на биопленки факторов микроокружения и механизмы восстановления всей популяции за счет клеток-персистеров (кругом обозначены – обычные клетки, черным квадратом – персистеры).

После воздействия антибиотиков и факторов иммунной защиты (антитела, фагоциты), элиминируют свободные планктонные формы клеток, в матриксе биопленки остаются только выжившие персистеры. Также показан каскад внутриклеточных регуляторных реакций клеток-персистеров: работа *hip*-локуса опосредующего выключение (OFF) важнейших физиологических процессов бактериальной клетки, и репрессии генов «домашнего хозяйства». После прекращения действия антибиотиков, материнская популяция восстанавливается, инфекционный процесс возобновляется. За основу модели был взят рисунок из книги: *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy* edited by John L. Pace et. al., 2006 (p. 245, Fig. 12.3).

популяция. Для макроорганизма этот процесс сопровождается хронизацией инфекции, появлением манифестирующих признаков заболевания, связанных с повторной активацией иммунной системы и действием вирулентных факторов клеток бактерий (рис. 3). С ростом популяции происходит создание вокруг биопленки иммуносупрессирующего микроокружения за счет синтеза специфических молекул, и вторичного синтеза протективной системы матрикса биопленки [1, 58].

Таким образом, современное осмысление биологии существования микроорганизмов, их поведение как колониально-социальных организмов позволяет иначе рассматривать процессы, лежащие в основе течения инфекции. Форма существования микроорганизмов в виде биопленок — это эволюционно выгодный способ надклеточной организации патогенных, условно-патогенных прокариот при паразитировании макроорганизма. На сегодняшний день биопленкообразование госпитальными штаммами бактерий является серьезной угрозой для практического здравоохранения. Особое значение это приобретает в отделениях интенсивной терапии, хирургических стационарах, поскольку образование биопленок является причиной возникновения тяжелых катетер и вентилятор-ассоциированных нозокомиальных инфекций, сепсисов, пневмоний и летальных исходов. Большие экономические потери связаны с неэффективной антибиотикотерапией инфекций биопленок. В связи с этим разрабатываются новые подходы для идентификации и изучения биопленок, это прежде всего, генотипирование, основанное на детекции специфических генов. Ведется разработка новых антибиотиков, изменение тактики антибиотикотерапии, а также поиск ингибиторов QS.

Литература

- Balaban N.Q. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch / N.Q. Balaban, [et. al.] // *Science*. — 2004. — Vol. 305, № 5690. — P. 1622–1625.
- Benkert B. Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation arcDABC operon / B. Benkert, [et. al.] // *Microbiology*. — 2008. — №154. — P. 3053–3060.
- Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy / ed. J.L. Pace, [et. al.]. — Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. — 495 p.
- Bjarnsholt T. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control / T. Bjarnsholt, [et al.] // *Expert Rev. Mol. Med.* — 2010. — №12. — P. 121–126.
- Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent / T. Bjarnsholt, [et. al.] // *Microbiology*. — 2005. — №151. — P. 373–383.
- Blango, M.G. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics / M.G. Blango, M.A. Mulvey // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2010. — Vol. 54, №5. — P. 855–863.
- Cassat J. Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390 / J. Cassat, [et. al.] // *Microbiology*. — 2006. — №152. — P. 3075–3090.
- Chen L.C. Ligand-receptor recognition for activation of quorum sensing in *Staphylococcus aureus* / L.C. Chen, [et. al.] // *J. Microbiol.* — 2009. — Vol. 47, №5. — P. 572–581.
- Cho S.H. Detection of the icaADBC gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections / S.H. Cho, [et. al.] // *Int. J. Antim. Agen.* — 2002. — Vol. 19, №6. — P. 570–575.
- Christensen L.D. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model / L.D. Christensen, [et. al.] // *Microbiology*. — 2007. — №153. — P. 2312–2320.
- Cirioni O. RNAIII-Inhibiting Peptide Significantly Reduces Bacterial Load and Enhances the Effect of Antibiotics in the Treatment of Central Venous Catheter-Associated *Staphylococcus aureus* Infections / O. Cirioni, [et. al.] // *J. of Inf. Dis.* — 2006. — №193. — P. 180–186.
- Collery M.M. Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, agr locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis / Mark M. Collery, [et. al.] // *J. of Med. Microb.* — 2008. — №57. — P. 348–358.
- Costerton J. W. *The Biofilm Primer*, Vol. 1 / J.W. Costerton. — Berlin: Springer, 2007. — 200 p.
- Costerton, J. W. Bacterial biofilms in nature and disease / J. W. Costerton [et. al.] // *Annu. Rev. Microbiol.* — 1987. — №41. — P. 435–464.
- Costi D. S. Quorum Sensing: Bacteria Talk Sense / D.S. Costi // *Clin. Inf. Dis.* — 2008. — №47. — P. 1070–1076.
- Darouiche R.O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence / R.O. Darouiche // *Clin. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 33, №9. — P. 1567–1572.
- Das. T. Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation T. Das, [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — P. 806–811.
- Davey M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2000. — №64. — P. 847–867.
- Diamond-Hernandez B. Production of icaADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections / B. Diamond-Hernandez, [et al.] // *BMC Infect. Dis.* — 2010. — №10. — P. 68–74.
- Donlan R.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // *CLIN. MIC. REV.* — 2002. — Vol. 15, № 2. — P. 167–193.
- Garcia-Castillo M. Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among clinical *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* isolates / M. Garcia-Castillo, [et. al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2008. — Vol. 62, №5. — P. 1027–1030.
- Garvis S. *Staphylococcus aureus* svrA: a gene required for virulence and expression of the agr locus / S. Garvis, [et. al.] // *Microbiology*. — 2002. — №148. — P. 3235–3243.
- Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms / F. Gotz // *Mol. Microb.* — 2002. — Vol. 43, №6. — P. 1367–1378.
- Hall-Stoodley L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // *Cell Microbiol.* — 2009. — Vol. 11, №7. — P. 1034–1043.
- Harrison J.J. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli* / Joe J. Harrison, [et. al.] // *Microbiology*. — 2005. — №151. — P. 3181–3195.

26. Hassett D. J. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways/ D.J. Hassett, [et. al.] // Trends. Microbiol. — 2009. — Vol. 17, №3. — P. 130–138.
27. Hóiby N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / Niels Hóiby, [et. al.] // Int. J. of Antimic. Agents. — 2010. — №35. — P. 322–332.
28. Holmes, C.J. Catheter-associated biofilm / C.J. Holmes // Contrib. Nephrol. — 1990. — № 85. — P.49–56.
29. Hunter, R.C. Mapping the speciation of iron in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using scanning transmission X-ray microscopy / R.C. Hunter, [et. al.] // Environ. Sci. Technol. — 2008. — Vol.42, №23. — P. 8766–8772.
30. Jian L. Bacterial Resistance to Antimicrobials: Mechanisms, Genetics, Medical Practice and Public Health / L. Jian, [et. al.] // Biot. Lett. — 2002. — Vol.24, №10. — P. 801–805.
31. Karatan, E. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms / E. Karatan, P. Watnick // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2009. — Vol. 73, №2. — P.310–347.
32. Keren I. Persister cells and tolerance to antimicrobials / I. Keren, [et. al.] // FEMS Microb. Lett. — 2004. — №230. — P. 13–18.
33. Keren I. Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli* / I. Keren, [et. al.] // J. Of Bact. — 2004. — Vol. 186, №24. — P. 8172–8180.
34. Kirov S.M. Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis / S. M. Kirov, [et. al.] // Microbiology. — 2007. — №153. — P. 3264–3274.
35. Kreft J-U. Biofilms promote altruism / J-U. Kreft // Microbiology. — 200. — №150. — P.2751–2760.
36. Lewis K. Persister cell / K. Lewis // Annu. Rev. Microbiol. — 2010. — №64. — P. 357–372.
37. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease / K. Lewis // Nat. Rev. Microbiol. — 2007. — №5. — P. 48–56.
38. Lewis K. Riddle of Biofilm Resistance / K. Lewis // J. Antimicrob. Chemother. — 2001. — Vol. 45, № 4. — P. 999–1007.
39. Li M. Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity / M. Li, [et. al.] J. of Med. Microb. — 2004. — №53. — P. 545–549.
40. Luján A. M. Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* *mutS* strain / A. M. Luján, [et. al.] // Microbiology. — 2007. — №153. — P. 225–237.
41. Manos J. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung / J. Manos, [et. al.] // J. of Med. Microb. — 2008. — №57. — P.1454–1465.
42. McAuliffe L. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival / L. McAuliffe, [et. al.] // Microbiology. — 2006. — №152. — P. 913–922.
43. McDougald, Signal-mediated cross-talk regulates stress adaptation in *Vibrio* species / D. McDougald, [et. al.] // Microbiology. — 2003. — Vol. 149, № 7. — P.1923–1933.
44. Mehta P. Information processing and signal integration in bacterial quorum sensing / P. Mehta, [et. al.] // Mol. Syst. Biol. — 2009 — №5. — P. 325.
45. Mo'ker N. *Pseudomonas aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules / N. Mo'ker, [et. al.] // J. of Bact. — 2010. — Vol. 192, № 7. — P. 1946–1955.
46. Mohamed J.A. Biofilm formation by enterococci / J.A. Mohamed, D.B. Huang // J. of Med. Microb. — 2007. — №56. — P.1581–1588.
47. Moons P. Bacterial interactions in biofilms / P. Moons, [et. al.] // Crit. Rev. Microbiol. — 2009. — Vol. 35, №3. — P. 157–168.
48. Nickel, J.C. Catheter-associated bacteriuria. An experimental study / J.C. Nickel, [et. al.] // Urology — 1985. — № 26(4). — P. 369–375.
49. Oglesby L. L. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization / Lashanda L. Oglesby, [et. al.] // Microbiology. — 2008. — №154. — P. 1605–1615.
50. Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs/ A. Pascual // Clin. Microbiol. Infect. — 2002. — Vol. 8, № 5. — P. 256–264.
51. Petrelli D. Analysis of methicillin-susceptible and methicillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital / D. Petrelli, [et. al.] // J. of Med. Microb. — 2008. — №57. — P. 364–372.
52. Qin Z. Formation and properties of in vitro biofilms of icanegative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates / Z. Qin, [et. al.] // J. of Med. Microb. — 2007. — №56. — P. 83–93.
53. Qiu D. ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* / D. Qiu, [et. al.] // Microbiology. — 2008. — №154. — P. 2119–2130.
54. Rakhimova E. *Pseudomonas aeruginosa* Population Biology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / E. Rakhimova, [et. al.] // J. Of Inf. Dis. — 2009. — №200. — P. 1928–1935.
55. Rasmussen K. Microelectrode measurements of local mass transport rates in heterogeneous biofilms / K. Rasmussen, Z. Lewandowski // Biotechnol. Bioeng. — 1998. — №59. — P.302–309.
56. Roberts M.E. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells / M.E. Roberts, P. S. Stewart // Microbiology. — 2005. — №151. — P. 75–80.
57. Roy V. Cross species quorum quenching using a native AI-2 processing enzyme // V. Roy, [et. al.] // ACS Chem. Biol. — 2010. — Vol. 5, №2. — P. 223–232.
58. Schumacher M.A. Molecular Mechanisms of HipA-Mediated Multidrug Tolerance and Its Neutralization by HipB / M.A. Schumacher, [et. al.] // Science. — 2009. — Vol. 323, №5912. — P. 396–401.
59. Simmons W.L. A Stochastic Mechanism for Biofilm Formation by *Mycoplasma pulmonis* / W.L. Simmons, [et. al.] // J. Bacteriol. — 2007. — Vol. 189, №3. — P. 1905–1913.
60. Simmons W. L. Biofilms Protect *Mycoplasma pulmonis* Cells from Lytic Effects of Complement and Gramicidin / W.L. Simmons, K. Dybvig // Infect. Immun. — 2007. — Vol. 75, №8. — P. 3696–3699.
61. Simmons W.L. *Mycoplasma* biofilms ex vivo and in vivo / W.L. Simmons, K. Dybvig // FEMS Microbiol. Lett. — 2009. — Vol. 295, №1. — P. 77–81.
62. Smith K. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus* / K. Smith, [et. al.] // J. of Med. Microb. — 2008. — №57. — P. 1018–1023.
63. Spoering A. L. GlpD and PlsB Participate in Persister Cell Formation in *Escherichia coli* / A. L. Spoering, [et. al.] // J. Of Bact. — 2006. — Vol. 188, №14. — P. 5136–5144.
64. Thoendel M. Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria / M. Thoendel, R. Horswill // Adv. Appl. Microbiol. — 2010. — №71. — P. 91–112.
65. Tomaras A.P. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology / A.P. Tomaras, [et. al.] // Microbiology. — 2008. — №154. — P. 3398–3409.

66. Tormo M.A. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? / M. A'ngeles Tormo, [et. al.] // Microbiology. — 2005. — №151. — P. 2465–2475.
67. Tormo M.A. Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (Bap) in Staphylococcus aureus / M. A'ngeles Tormo, [et. al.] // Microbiology. — 2007. — №153. — P.1702–1710.
68. Traber K.E. agr function in clinical Staphylococcus aureus isolates / Katrina E. Traber, [et. al.] // Microbiology. — 2008. — №154. — P. 2265–2274.
69. Van Alst N. E. Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in Pseudomonas aeruginosa / N.E. Van Alst, [et. al.] // Infect. Immun. — 2007. — Vol.75, №8. — P. 3780–3790.
70. Vergara-Irigaray M. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the Staphylococcus aureus cell surface / M. Vergara-Irigaray, [et. al.] // Microbiology. — 2008. — №154. — P.865–877.
71. Vu B. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation / B. Vu [et. al.] // Molecules. — 2009. — Vol. 14, №7. — P. 2535–2554.
72. Vuong C. Increased Colonization of Indwelling Medical Devices by Quorum-Sensing Mutants of Staphylococcus epidermidis In Vivo / C. Vuong, [et. al.] // J. of Inf. Dis. — 2004. — №190. — P. 1498–505.
73. Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world / P. Williams // Microbiology. — 2007. — №153. — P. 3923–3938.
74. Xavier J. B. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix — a modelling study / J.B. Xavier, [et. al.] // Microbiology. — 2005. — №151. — P. 3817–3832.
75. Xiong Y. Q. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Persistent Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Bacteremia In Vitro and in an Experimental Endocarditis Model / Yan Q. Xiong, [et. al.] // J. of Inf. Dis. — 2009. — №199. — P. 201–209.
76. Yao Y. Genomewide Analysis of Gene Expression in Staphylococcus epidermidis Biofilms: Insights into the Pathophysiology of S. epidermidis Biofilms and the Role of Phenol-Soluble Modulins in Formation of Biofilms / Y. Yao, [et. al.] // J. of Inf. Dis. — 2005. — №191. — P. 289–298.

Авторский коллектив:

Гостев Владимир Валерьевич — младший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГУ «Научно-исследовательского института детских инфекций Федерального медико-биологического агентства России» тел.: 8-905-220-97-41, e-mail: wwguest@rambler.ru;

Сидоренко Сергей Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГУ «Научно-исследовательского института детских инфекций Федерального медико-биологического агентства России», тел.: 8(963)316-08-08, e-mail: sidorserg@gmail.com