

ОБЗОРЫ

© Андрияков Б.Г., Ляпун И.Н., 2020



Молекулярные механизмы персистенции бактерий

Андрияков Б.Г.^{1,2✉}, Ляпун И.Н.¹

¹ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Минобрнауки РФ, 690087, Владивосток, Россия;

²ФГБОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», 690087, Владивосток, Россия

Высокий уровень смертности от инфекционных болезней в значительной степени опосредован повсеместным и неконтролируемым использованием антибиотиков, что привело к появлению лекарственно-резистентных штаммов бактерий. Быстрая эволюция резистентности бактерий к антимикробным препаратам является серьезным вызовом для современного здравоохранения, обуславливает необходимость создания новых антибиотических средств, а также активизации изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования устойчивости микроорганизмов. Одним из таких механизмов является бактериальная персистенция, которая проявляется образованием в микробной культуре клеток-персистеров, являющихся фенотипическим вариантом изогенной популяции. Персистенция бактерий может возникать самопроизвольно, независимо от воздействия антимикробных средств или причин, связанных с окружающей средой (недостаток питательных веществ, окислительный стресс или гипоксия). Эта небольшая по численности генерация клеток способна сохранять жизнеспособность даже в присутствии антимикробных средств в концентрациях, многократно превышающих терапевтические. Наличие в организме персистерных клеток патогенных бактерий снижает эффективность антибиотического лечения не в связи с генотипической лекарственной устойчивостью микроорганизма, а вследствие наличия фенотипической резистентности клеток-персистеров. Различие принципиальное, поскольку персистеры нечувствительны ко всем антибиотикам и для их эрадикации необходима разработка принципиально новых антимикробных стратегий. Клетки-персистеры представляют собой фенотипические варианты материнской культуры бактерий, которые присутствуют во всех популяциях микроорганизмов, а после наступления благоприятных условий способны рекультивироваться и сформировать новую генерацию вегетативных бактерий. В обзоре рассмотрены современные концепции молекулярно-генетических механизмов персистенции бактерий с акцентом на их клиническое значение для возникновения персистирующих инфекций, а также обсуждаются инновационные технологии эрадикации устойчивых клеточных форм микроорганизмов.

Ключевые слова: персистенция бактерий; персистирующие инфекции; молекулярные механизмы; клетки-персистеры; резистентность; эрадикация; современные технологии.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР № 0545-2019-0007 «Молекулярные механизмы образования устойчивых некультивируемых форм бактерий».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Андрияков Б.Г., Ляпун И.Н. Молекулярные механизмы персистенции бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(3): 271–279.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-10>

Поступила 02.03.2020
Принята в печать 16.04.2020

Molecular Mechanisms of Persistence of Bacteria

Boris G. Andryukov^{1,2✉}, Irina N. Lyapun¹

¹Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia;

²Pacific State Medical University, 690087, Vladivostok, Russia

A significant mortality rate from infectious diseases is largely mediated by the widespread and uncontrolled use of antibiotics, which has led to the emergence of drug-resistant strains of bacteria. The rapid evolution of

bacterial resistance to antimicrobials is a serious challenge for modern health care, mediates the need to create new antibiotic agents, as well as to intensify the study of molecular mechanisms underlying the formation of microorganism resistance. One of these mechanisms is bacterial persistence, manifested by the formation of persistent cells in the culture, which are a phenotypic variant of the isogenic population. The persistence of bacteria can occur spontaneously, regardless of exposure to antimicrobials or environmental reasons, such as lack of nutrients, oxidative stress or hypoxia. This small cell subpopulation is able to maintain viability even in the presence of antimicrobial agents at concentrations many times higher than therapeutic. The presence of persistent cells of pathogenic bacteria in the host organism reduces the effectiveness of antibiotic treatment, not due to the genotypic drug resistance of the microorganism, but due to the presence of phenotypic resistance of persister cells. The difference is fundamental, since cell-persisters are insensitive to any antibiotics and the development of fundamentally new antimicrobial strategies is necessary for their eradication. Persister cells are phenotypic variants of the maternal culture of bacteria that are present in all populations of microorganisms, and after the onset of favorable conditions, they are able to reclaim and form a new generation of vegetative bacteria. This review discusses modern concepts of the molecular genetic mechanisms of bacterial persistence with an emphasis on their clinical significance for the occurrence of persistent infections, and discusses innovative technologies for the eradication of resistant cell forms of microorganisms.

Keywords: *bacterial persistence; persistent infections; molecular mechanisms; persister cells; resistance; eradication; modern technologies.*

Acknowledgments. This work was carried out as part of a state assignment on the topic of research No. 0545-2019-0007 «Molecular mechanisms of the formation of stable uncultivated forms of bacteria».

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Andryukov B.G., Lyapun I.N. Molecular mechanisms of persistence of bacteria. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(3): 271–279. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-10>

Received 2 March 2020
 Accepted 16 April 2020

Введение

Вскоре после открытия и триумфального применения для лечения бактериальных инфекций антибиотиков, ознаменовавших начало новой исторической эпохи в медицине, американский микробиолог Gladys L. Hobby (1942) впервые обратила внимание на загадочное явление — отсутствие полной стерилизации пенициллином культуры *S. aureus* [1]. Небольшая выжившая часть клеток продолжала оставаться жизнеспособной, а при наступлении благоприятных условий давала начало новой микробной популяции — такой же чувствительной к антибиотикам.

Это наблюдение стало убедительным доказательством того, что новая популяция бактерий сохранила биологические свойства материнской культуры и не представляет собой генетически модифицированный пенициллин-резистентный штамм, а выжившие клетки являются его фенотипической разновидностью. Выявленная генерация клеток под влиянием антибиотикотерапии временно изменила свои биологические свойства, свела к минимуму метаболическую и репродуктивную активность для последующего возрождения погибшей популяции. Удивительная устойчивость этих клеток к антибиотикам не стала наследуемым признаком, а природа этого феномена имеет совершенно иные механизмы, чем природная резистентность бактерий к антимикробным препаратам, опосредуемая генетическими мутациями.

Спустя 2 года J.W. Bigger (1944) получил аналогичные результаты и назвал выжившую субпопуляцию бактерий клетками-персисторами («неделяющиеся, бездействующие клетки») [2]. Однако на волне эйфории от успехов применения антибиотиков в 1940–1970-е гг. работы G.L. Hobby и J.W. Bigger не получили должного внимания, и дальнейшие исследования клеточной персистенции прекратились [3, 4]. Кроме того, клетки-персисторы не культивировались на обычных питательных средах и не проявляли метаболическую активность, что затрудняло их выявление и изучение традиционными микробиологическими методами [4, 5] (рис. 1).

На рубеже XX и XXI вв. появление устойчивых к антимикробным препаратам штаммов патогенных бактерий стало серьезной угрозой глобальному здравоохранению, и с трибуны ВОЗ заговорили о грядущем закате эры антибиотиков. В последние десятилетия на фоне роста инфекционной патологии заболевания все чаще стали принимать затяжной или хронический характер и ассоциироваться с условно-патогенными микроорганизмами и госпитальным заражением пациентов [6].

В сложившихся условиях поиск и создание новых антибиотиков становится все более сложным, все менее перспективным и экономически нерентабельным процессом. А для эффективной борьбы с резистентностью бактерий требуются разработка инновационных антимикробных стратегий, новые мишени и решения. Одним из перспективных под-

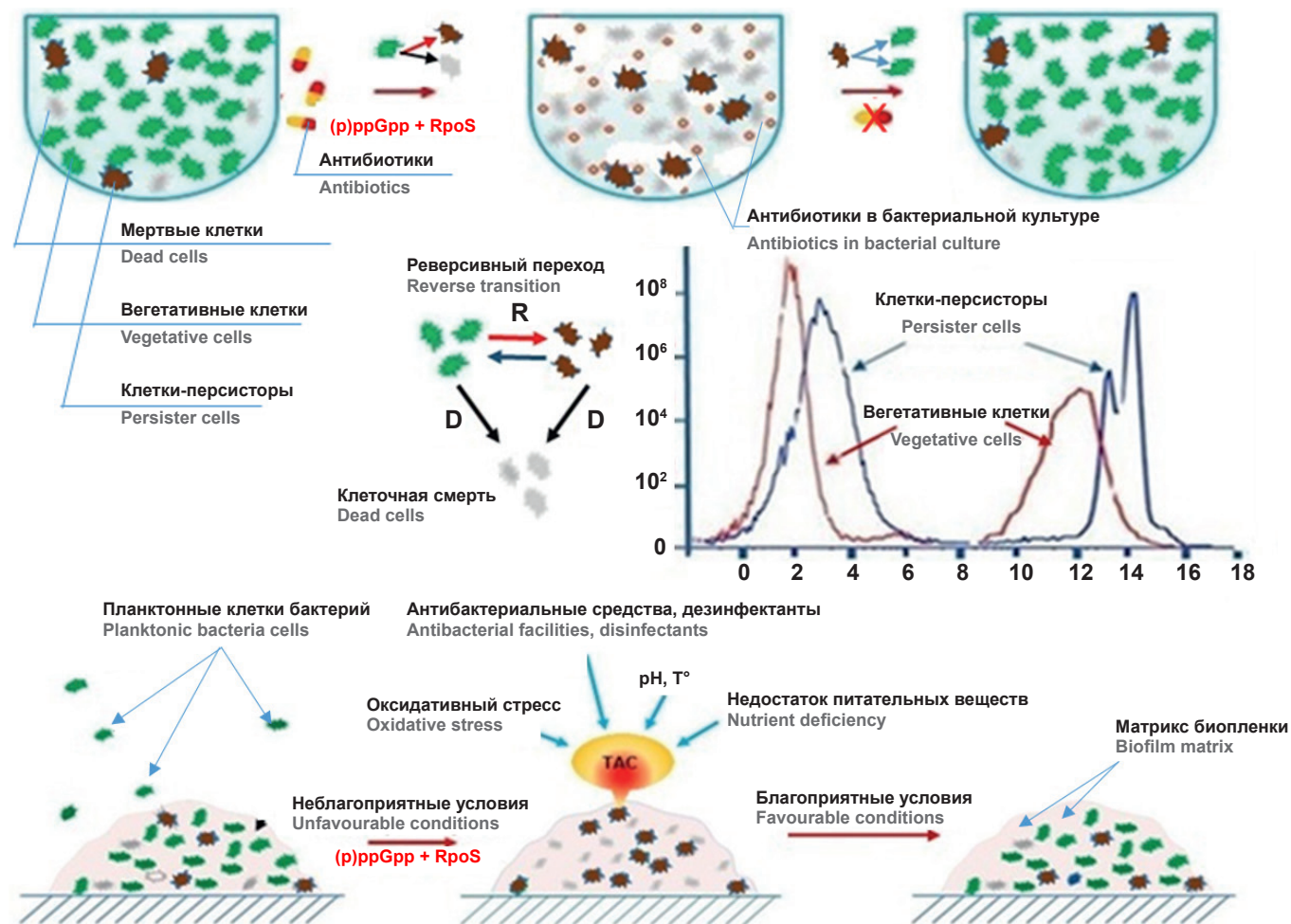


Рис. 1. Субпопуляция персистерных клеток бактерий является устойчивой к антибиотикам. После гибели большей части вегетативных бактерий и окончания антибиотикотерапии клетки-персисторы восстанавливают популяцию материнской культуры клеток.

Fig. 1. A subpopulation of persistent bacteria cells is resistant to antibiotics.

After the death of most vegetative bacteria and the end of antibiotic therapy, persister cells restore the population of maternal cell culture.

ходов является изучение персистенции бактерий. Растущий научный интерес к этому биологическому феномену стал особенно заметен на фоне появления новых сведений о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе их устойчивости [3, 5, 6].

В этом обзоре рассматриваются современные концепции молекулярно-генетических механизмов персистенции бактерий с акцентом на их клиническом значении для возникновения персистирующих инфекций, обсуждаются инновационные технологии эрадикации устойчивых клеточных форм микроорганизмов.

Персистенция бактерий

Одними из ключевых признаков жизнеспособности любой прокариотической клетки являются согласованное воспроизведение интрацеллюлярных структур и синтез макромолекул. Однако открытие в середине XX в. феномена персистенции бактериальных клеток и последующее его изучение

позволили расширить представление об адаптационных стратегиях микроорганизмов и механизмах сохранения ими патогенного потенциала [7–10].

Впоследствии было показано, что большинство бактериальных культур, находясь в стационарной фазе роста и благоприятных условиях, имеет небольшую (1–3%) неделиющуюся фенотипическую субпопуляцию персистеров, биологической функцией которых является сохранение популяции в случае внезапно наступивших изменений условий среды обитания [5, 6, 11].

Помимо постоянного присутствия этой клеточной субпопуляции в любой культуре прокариот, увеличение их численности происходит в ответ на возникающую угрозу любых неблагоприятных факторов среды обитания. Кроме уже обсуждавшегося влияния антимикробных средств, это могут быть дефицит (отсутствие) питательных веществ, оксидативный стресс, гипоксия, изменение температуры [6, 9, 10].

В зависимости от условий существования, фазы роста и условий среды обитания микробной популяции происходит постоянная трансформация вегетативных форм в генерацию клеток-персистеров и обратно [3, 4]. При этом численность бездействующей популяции может значительно варьировать, а в условиях дефицита (отсутствия) питательных веществ достигать почти тотального перехода всей популяции в состояние персистенции [12]. Биологическое значение присутствия и образования этих анабиотических клеточных генераций заключается в сохранении популяций после длительного и экстремального по величине воздействия неблагоприятных факторов [7, 8, 13].

В процессе жизнедеятельности вегетативные (активные) бактериальные клетки популяций могут трансформироваться в персистентный фенотип и обратно, при этом скорость этих реверсий ориентирована на фазы роста и условия среды обитания [3, 7, 8].

На основании полученных данных был сделан вывод о более широкой биологической функции клеток-персистеров и связи индукции генерации этой бактериальной субпопуляции не только с влиянием антибиотиков. Например, феномен персистенции бактерий в последние годы все чаще рассматривается в качестве универсальной адаптационной («оборонительной») стратегии микроорганизмов в ответ на конкурентный стресс, являющейся результатом межвидовых взаимодействий и имеющей большое значение для сохранения популяции в сообществе с доминантными видами [14–16].

За десятилетия изучения феномена персистенции бактерий установлено, что клетки-персистеры, в отличие от вегетативных клеточных форм, находятся в состоянии метаболического и репродуктивного покоя. Это позволяет им уклоняться от врожденных механизмов иммунной защиты организма-хозяина и сохранять жизнеспособность после воздействия экстремальных факторов среды обитания, в том числе влияния антибиотиков, многие из которых активны по отношению только к делящимся клеткам [8, 13, 15]. Механизмы большинства из них нацелены на ингибирование ключевых внутриклеточных звеньев метаболизма и репродукции: синтеза белков, клеточной стенки и репликации нуклеиновых кислот [17].

Безусловно, наличие в организме неактивных устойчивых клеточных форм патогенных бактерий в значительной степени способствует возникновению персистирующих инфекций и их возможных последствий: увеличению заболеваемости и смертности от самой инфекции, а также повышенному риску ее распространения [13, 14, 18]. Наличие в организме этой бездействующей генерации бактерий снижает эффективность антибиотического лечения, что опосредовано не генетической лекар-

ственной устойчивостью микроорганизма, а резистентностью фенотипического варианта изогенной популяции — клеток-персистеров. Таким образом, в отличие от генотипической резистентности микроорганизмов, устойчивость при персистенции бактерий временна и обратима. Различие принципиальное, поскольку персистеры не чувствительны к любым антибиотикам, а для их эрадикации необходима разработка принципиально новых антимикробных стратегий. Поэтому лечение персистирующих инфекций затруднено и, как правило, связано с необходимостью продолжительных или многократных курсов антимикробной терапии [3, 4, 17, 18].

В последние десятилетия установлено, что персистенция является универсальным явлением. Она обнаружена не только у бактерий и архей, но и у вирусов [19], грибов [20], одноклеточных водорослей [21], раковых клеток [22], семян растений [23], что предполагает наличие общих закономерностей и общебиологическое значение этого феномена для выживания систем в различных стрессовых условиях [5, 7, 24].

Формирование в бактериальной культуре генерации клеток-персистеров хорошо объясняет инновационная парадигма фенотипической гетерогенности популяций, являющейся чаще всего следствием спонтанного механизма молекулярного стохастического переключения фенотипа во время экспоненциальной или стационарной фазы роста микроорганизмов [5, 11, 12]. Однако формирование персистеров может быть опосредовано и адаптивными механизмами в ответ на экстремальные условия среды обитания, а также в начале стационарной фазы при нутриентном истощении [5, 13, 15]. Это приводит к появлению фенотипической гетерогенности, которая повышает жизнеспособность бактериальной популяции [14, 25–27].

Феномен персистенции бактерий согласуется с гипотезой континуума клеточного покоя. Согласно этой гипотезе, образование клеток-персистеров наряду с формированием жизнеспособных, но некультивируемых (viable but non-culturable, VBNC) клеточных форм бактерий рассматривается в качестве одного из наиболее распространенных способов выживания бактерий в неблагоприятных условиях [28–30].

Сходство обстоятельств формирования и морфологических признаков указывает на достаточно близкое родство этих устойчивых клеточных форм, однако есть экспериментальные данные, показывающие, что VBNC является формой более глубокого покоя. Для восстановления параметров роста этих жизнеспособных, но некультивируемых бактерий после прекращения действия стрессора необходимо больше времени (до суток и более), тогда как клетки-персистеры рекультивируются после завер-

шения антибиотикотерапии на плотных питательных средах в течение нескольких часов [28, 30, 31]. Это обстоятельство позволило некоторым авторам предположить, что клетки-персисторы являются переходной формой трансформации в VBNC-состояние [12].

Некоторые авторы [28–30] ставят знак равенства между клетками-персисторами и VBNC, объединяя их на основании сходства обстоятельств формирования, морфологических, физиологических признаков, а также молекулярно-генетических механизмов возникновения.

Молекулярно-генетические механизмы персистенции бактерий

Еще в 1950-е гг. исследователи задавались вопросом о функционировании отдельных клеток микроорганизмов. Этот интерес был основан на интуитивном понимании того, что физиология отдельных клеток в изогенных популяциях бактерий может отличаться от большинства других. Несмотря на то что бактериальная персистенция известна уже около 80 лет, генерация клеток-персисторов изучена мало. Технические проблемы с получением лабораторной модели dormantных клеток и невозможность их культивирования на обычных питательных средах дополнялись отсутствием чувствительных аналитических инструментов для изучения персистенции бактерий [11, 13, 28].

Значительные достижения молекулярной биологии и генетики в начале XXI в. расширили представления о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе персистенции бактерий. С появлением и развитием концепции микробиологии отдельных клеток (single-cell microbiology) были разработаны новые аналитические инструменты и методы одноклеточной изоляции (раман-спектрометрия, микрофлюидика, проточная цитометрия, компартментализация) [32–34]. Появилась возможность выделять и выращивать ранее некультивируемые одиночные клетки для проведения оценки жизнеспособности, а также мониторинга физиологии и функций отдельных клеток, что было невозможно 10–15 лет назад [35–39].

В зависимости от целей и задач исследований эти методы сочетаются с секвенированием РНК (scRNA-seq), а также с генетическим, макромолекулярным, пространственным, протеомным профилированием одиночных клеток [35–37]. С помощью этих методов установлено, что в регуляции образования клеток-персисторов принимают участие различные независимые молекулярные механизмы [40–43].

Каждый из этих механизмов приводит к формированию в популяции небольшой генерации дремлющих клеток. Например, реагируя на различные внешние раздражители, бактерии используют

сенсорные системы, трансформирующие внешние сигналы в модуляцию внутриклеточного содержания вторичных мессенджеров-индукторов. Среди них внутриклеточные нуклеотидные молекулы-алармоны (p)ppGpp (гуанозин пентафосфат и гуанозин тетрафосфат). Они играют ключевую роль в ответе бактериальной клетки на внешние раздражители, выполняя функцию одного из основных медиаторов «строгого контроля» и регулятора активности метаболизма [42–45]. В свою очередь, концентрация этих молекул в клетке регулируется ppGpp-синтазами, активность которых зависит от содержания аминокислот, при непосредственном участии суперсемейства гормонов RelA/SpoT, синтезирующих ppGpp [42, 44, 46].

Эти молекулы опосредуют формирование клеток-персисторов путем изменения активности ряда ферментов, в первую очередь ДНК-праймазы, лизиндекарбоксилазы, РНК-полимеразы и др., а также в качестве сигнальных молекул регулируют скорость репликации бактерий и их метаболическую активность [44, 47, 48]. Кроме того, вторичный мессенджер (p)ppGpp был идентифицирован как регулятор активности многочисленных генетических оперонов, кодирующих токсин-антитоксिनные системы (ТАС) прокариот, открытых в конце XX в. [49]. Их изучение позволило установить широкую распространенность у бактерий этих важнейших оперонов [28, 50–52]. Последующее установление связи ТАС с формированием фенотипа бактериальной персистенции стало мощным стимулом изучения этих генетических локусов, в значительной степени опосредующих устойчивость прокариот к антибактериальным препаратам [42, 43, 48].

За последние десятилетия выявлено, что генетические опероны ТАС состоят из двух промоторов, расположенных по соседству на хромосомах и плаزمиде. Они регулируют синтез стабильного токсина и нестабильного антитоксина, чувствительного к клеточным протеазам. В нормальных условиях эти системы представляют собой нетоксичный комплекс, в котором антитоксин блокирует комплементарный токсин путем прямого связывания мРНК [42, 48].

Увеличение уровня (p)ppGpp вызывает снижение активности экзополифосфатаз и повышение внутриклеточного содержания полифосфата. Эти высокомолекулярные полимеры при участии Lon-протеазы опосредуют деградацию антитоксина, деполаризацию клеточных мембран, а также значительное ингибирование активности метаболизма и угнетение репродукции [46, 47, 51] (рис. 2).

При наступлении экстремальных условий обитания происходит деградация антитоксина гомолигомерной АТФ-зависимой Lon(La)-протеазой и двухкомпонентными протеазными системами

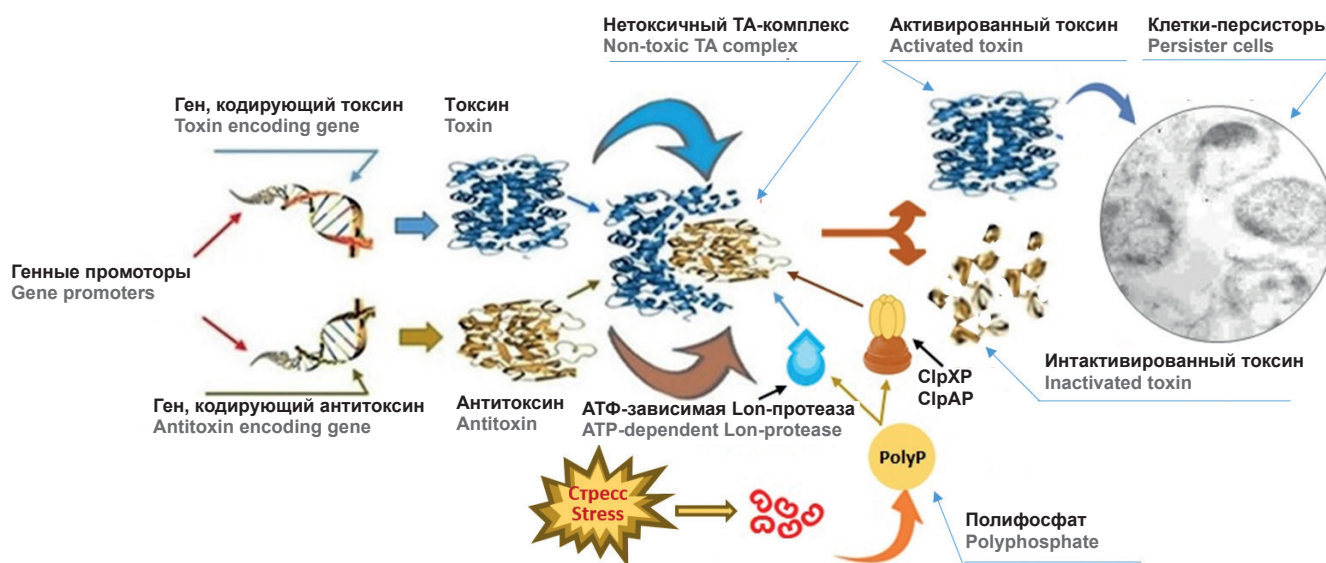


Рис. 2. Молекулярно-генетические механизмы формирования фенотипа персистенции у бактерий.
Fig. 2. Molecular genetic mechanisms of the formation of the phenotype of persistence in bacteria.

ClpXP и ClpAP, в результате чего освобождается и активируется токсин. Клеточной мишенью активного токсина становятся внутриклеточные ферменты, ингибирование которых опосредует значительное замедление скорости синтеза белка и клеточной стенки, угнетение метаболизма и репликации ДНК бактерий, что приводит к частичной или полной их устойчивости к этиотропной антибактериальной терапии [43, 50].

Так, активация токсина RelE (локус *RelEB*), согласно данным [51], повышает устойчивость *E. coli* к ванкомицину в 10 тыс. раз, а высвобождение токсина YafQ (локус TA *DinJ-YafQ*) снижает чувствительность этой же бактерии к цефалоспориновому антибиотику I поколения, цефазолину, в 2400 раз. При этом важно, что гены TAC, расположенные на плаزمидах, способны в биопленках переноситься горизонтально к другим патологическим микроорганизмам, придавая им устойчивость к антибиотикам [27, 48, 51].

К настоящему времени установлено существование 6 типов модулей TAC, которые отличаются строением антитоксинов и характером их взаимодействия с комплементарными токсинами [42, 43, 48]. Первоначально ведущая роль в формировании клеточной персистенции отводилась наиболее изученному модулю TAC II типа и его локусу *hipBA*, содержащему первый открытый у *E. coli* ген устойчивости бактерий *hipA*. В этом типе TAC токсин и антитоксин являются протеинами [42, 46, 51]. Однако в дальнейшем показано участие и других типов TAC в формировании устойчивости бактерий [27, 52–54].

В различных типах TAC используются разные механизмы активации токсина, что в итоге приводит к его высвобождению, замедлению метаболиз-

ма и остановке репродуктивной активности, образованию клеток-персистеров. Последующие исследования показали, что и другие типы модулей TAC вызывают сверхэкспрессию токсинов в дормантных клетках дикого штамма *E. coli* (локусы *tisB-istR*, *hokB-sokB* и др.) [43, 46, 47]. Чрезмерная активация токсинов приводит к разрушению и гибели клеток, а этот механизм предлагается в качестве одной из перспективных стратегий, направленных на борьбу с персистенцией бактерий и их фенотипической резистентностью к антибиотикам.

Перспективные стратегии борьбы с персистенцией бактерий

Возрастающее клиническое значение персистенции бактерий делает все более актуальным поиск принципиально иных стратегий, направленных на борьбу с дормантными формами патогенных микроорганизмов, и альтернативных клеточных мишеней (таблица).

С учетом устойчивости клеток-персистеров к традиционным антибиотикам для их эрадикации было предложено использовать разрешенные к применению противораковые препараты цисплатин и митомицин С (образуют внутрицепочечные сшивки ДНК). Использование этих препаратов против устойчивых клеток клинических штаммов *E. coli* O157:H7 (EHEC), *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* показало высокую эффективность и перспективность для лечения хронических инфекций [55].

Открытие ключевой роли токсин-антитоксिनных модулей в физиологии бактерий, а также (p)rrGpp в формировании генерации устойчивых к антибиотикам клеточных форм естественным образом связало одно из направлений научного поиска меха-

Современные стратегии, направленные на ингибирование бактериальной персистенции
 Modern strategies aimed at inhibiting bacterial persistence

Мишень Target	Механизм Mechanism	Модель Model	Ссылка Link
Клетки-персисторы Persister cells	ДНК-сшивающие агенты проникают в клетки-персисторы и убивают их (цисплатин и митомицин С) DNA cross-linking agents penetrate and kill persister cells (cisplatin and mitomycin C)	<i>E. coli</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i>	55
Блокирование синтеза (p)ppGpp Block synthesis (p)ppGpp	Связывание каталитических домены RelA/SpoT синтетическим аналогом Relacin The binding of the catalytic domains RelA/SpoT synthetic analog Relacin	<i>M. tuberculosis</i>	47
Литическая протеаза ClpP Lytic protease ClpP	Активация (модуляция активности) литической протеазы ClpP Activation (modulation of activity) of the lytic protease ClpP	<i>Staphylococcus aureus</i>	56
Токсин-антитоксиновые модули типа II Type II toxin antitoxin modules	Ингибирование образования комплекса ТАС, прямая активация токсина после введения биомолекул для связывания антитоксина Inhibition of the formation of the TAS complex, direct activation of the toxin after the introduction of biomolecules for antitoxin binding	<i>E. coli</i>	52
	Активация токсина mazE пептидными олигомерами нуклеиновых кислот Activation of mazE toxin by nucleic acid peptide oligomers	<i>Neisseria meningitidis</i>	53
	Фармацевтическое ингибирование трансляции антитоксинов антисмысловой РНК Pharmaceutical inhibition of antisense RNA antitoxin translation	<i>E. coli</i>	51
	Искусственная активация ТАС антисмысловыми пептидными олигомерами нуклеиновых кислот Artificial TAS activation by antisense peptide nucleic acid oligomers	<i>E. coli</i>	57

низмов ингибирования образования клеток-персисторов с этими алармическими системами [43, 47, 48]. Например, K. Syal с коллегами [47] показали, что блокирование синтеза (p)ppGpp опосредуется связыванием активности каталитических доменов синтетаз/гидролаз RelA/SpoT этого мессенджера у *Mycobacterium tuberculosis* синтетическим аналогом Relacin.

В.Р. Conlon и соавт. [56] пришли к выводу, что ацилдепсипептидный антибиотик (ADEP4), модулируя активность протеазы ClpP, убивает персистирующие клетки, разлагая более 400 внутриклеточных белков.

В последние годы как перспективная инновационная стратегия было предложено использование ТАС в качестве антибактериальных внутриклеточных мишеней [52, 53]. Научный интерес к ТАС в качестве антибактериальных стратегий обусловлен, с одной стороны, их широким распространением среди бактериальных геномов, а с другой — отсутствием в клетках эукариот, в частности ТАС не имеют аналогов у человека. Основные механизмы использования ТАС связаны с блокированием образования (деградацией) антитоксина, что приводит к разрушению комплементарным токсином дочерней клетки («постсегрегационное убийство»). Другая группа стратегий связана с искусственной активацией токсина или ингибированием образования ТАС [46, 57].

Заключение

Об окончательном раскрытии молекулярных механизмов персистенции бактерий пока говорить преждевременно. Их изучение находится в активной стадии, и возможно, что в скором времени появятся новые противомикробные стратегии, направленные на эрадикацию клеток-персисторов, которые расширят и дополнят существующие схемы традиционной антибиотикотерапии.

Однако рассчитывать на легкую борьбу с бактериальной персистенцией, по-видимому, не стоит. Механизмы персистенции слишком избыточны и специфичны для каждого вида микроорганизмов, а единый и универсальный метод эрадикации устойчивых клеток пока не просматривается.

На сегодняшний день наиболее успешные результаты были получены при использовании различных метаболитов (например, маннита, глюкозы, кардиолипина и др.) для рекультивирования клеток-персисторов с последующей аминогликозидопосредованной эрадикацией [39, 40, 43].

Актуальность разработки методов борьбы с бактериальной персистенцией обоснована с позиции научной и практической значимости проблемы и экономической целесообразности. Лечение персистирующих инфекций, таких как туберкулез, требует длительных курсов приема значительных доз антибиотиков. Создание комбинированных схем лечения, направленных на эрадикацию инфекцион-

ного патогена и его устойчивых клеточных субпопуляций, позволит оптимизировать схемы лечения, снизить его стоимость и повысить эффективность.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hobby G.L., Meyer K., Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. *Proc. Soc. Exp. Biol. NY.* 1942; 50(2): 281-5. DOI: <http://doi.org/10.3181/00379727-50-13773>
- Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet.* 1944; 244(6320): 497-500. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- van den Bergh B., Michiels J.E., Fauvart M., Michiels J. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2016; 14(7): 613-16. DOI: <http://doi.org/10.1080/14787210.2016.1194754>
- Rehab Mahmoud abd El-Baky. The future challenges facing antimicrobial therapy: resistance and persistence. *Am. J. Microbiol. Res.* 2016; 4(1): 1-15. DOI: <http://doi.org/10.12691/ajmr-4-1-1>
- Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science.* 2004; 305(5690): 1622-5. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1099390>
- Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64: 357-72. DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- van Teeseling M.C.F., de Pedro M.A., Cava F. Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1264. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
- Kysela D.T., Randich A.M., Caccamo P.D., Brun Y.V. Diversity takes shape: understanding the mechanistic and adaptive basis of bacterial morphology. *PLoS Biol.* 2016; 14(10): e1002565. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002565>
- Kawai Y., Mercier R., Errington J. Bacterial cell morphogenesis does not require a preexisting template structure. *Curr. Biol.* 2014; 24(8): 863-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.053>
- Harms A., Maisonneuve E., Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science.* 2016; 354(6318): aaf4268. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.aaf4268>
- Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell.* 2014; 157(3): 539-48. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>
- Orman M.A., Brynildsen M.P. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat. Commun.* 2015; 6: 7983. DOI: <http://doi.org/10.1038/ncomms8983>
- Randich A.M., Brun Y.V. Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 580. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00580>
- Stubbendieck R.M., Straight P.D. Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J. Bacteriol.* 2016; 198(16): 2145-55. DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.00275-16>
- Gaivão M., Dionisio F., Gjini E. Transmission fitness in cocolonization and the persistence of bacterial pathogens. *Bull. Math. Biol.* 2017; 79(9): 2068-87. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11538-017-0320-3>
- Dorosky R.J., Pierson L.S., Pierson E.A. *Pseudomonas chlororaphis* produces multiple R-Tailocin particles that broaden the killing spectrum and contribute to persistence in rhizosphere communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84(18): e01230-18. DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.01230-18>
- Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15(8): 453-64. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
- Grant S.S., Hung D.T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence.* 2013; 4(4): 273-83. DOI: <http://doi.org/10.4161/viru.23987>
- Randall R.E., Griffin D.E. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Virol.* 2017; 23: 35-42. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.001>
- Böhm L., Torsin S., Tint S.H., Eckstein M.T., Ludwig T., Pérez J.C. The yeast form of the fungus *Candida albicans* promotes persistence in the gut of gnotobiotic mice. *PLoS Pathog.* 2017; 13(10): e1006699. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006699>
- Codony F., Miranda A.M., Mas J. Persistence and proliferation of some unicellular algae in drinking water systems as result of their heterotrophic metabolism: short communication. *Water SA.* 2003; 29(1): 113-6. DOI: <http://doi.org/10.4314/wsa.v29i1.4953>
- Pearl Mizrahi S., Gefen O., Simon I., Balaban N.Q. Persistence to anti-cancer treatments in the stationary to proliferating transition. *Cell Cycle.* 2016; 15(24): 3442-53. DOI: <http://doi.org/10.1080/15384101.2016.1248006>
- Long R.L., Gorecki M.J., Renton M., Scott J.K., Colville L., Goggin D.E., et al. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2015; 90(1): 31-59. DOI: <http://doi.org/10.1111/brv.12095>
- Yafremava L.S., Wielgos M., Thomas S., Nasir A., Wang M., Mittenthal J.E., et al. A general framework of persistence strategies for biological systems helps explain domains of life. *Front. Genet.* 2013; 4: 16. DOI: <http://doi.org/10.3389/fgene.2013.00016>
- van Boxtel C., van Heerden J.H., Nordholt N., Schmidt P., Bruggeman F.J. Taking chances and making mistakes: non-genetic phenotypic heterogeneity and its consequences for surviving in dynamic environments. *J. R. Soc. Interface.* 2017; 14(132): 20170141. DOI: <http://doi.org/10.1098/rsif.2017.0141>
- Smith S.E. Organisms as persisters. *Theor. Pract. Biol.* 2017; 9(14). DOI: <http://doi.org/10.3998/ptb.6959004.0009.014>
- Pu Y., Ke Y., Bai F. Active efflux in dormant bacterial cells — new insights into antibiotic persistence. *Drug Resist. Updat.* 2017; 30: 7-14. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.drup.2016.11.002>
- Kim J.S., Wood T.K. Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. *mBio.* 2017; 8(2): e00354-17. DOI: <http://doi.org/10.1128/mBio.00354-17>. Available at: <http://mbio.asm.org/content/8/2/e00354-17.long>
- Ayrapetyan M., Williams T.C., Baxter R., Oliver J.D. Viable but non-culturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum. *Infect. Immun.* 2015; 83(11): 4194-03. DOI: <http://doi.org/10.1128/IAI.00404-15>
- Ayrapetyan M., Williams T., Oliver J.D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *J. Bacteriol.* 2018; 200(20): e00249-18. DOI: <http://doi.org/10.1128/JB.00249-18>
- Amato S.M., Fazan C.H., Henry T.C., Mok W.W., Orman M.A., Sandvik E.L., et al. The role of metabolism in bacterial persistence. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 70. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00070>
- Ishii S., Tago K., Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: Methods and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 86(5): 1281-92. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2524-4>
- Li M., Xu J., Romero-Gonzalez M., Banwart S.A., Huang W.E. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012; 23(1): 56-63. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.019>
- Mazutis L., Gilbert J., Ung W.L., Weitz D.A., Griffiths A.D., Heyman J.A. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat. Protoc.* 2013; 8(5): 870-91. DOI: <http://doi.org/10.1038/nprot.2013.046>
- Stuart T., Satija R. Integrative single-cell analysis. *Nat. Rev. Genet.* 2019; 20(5): 257-72. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41576-019-0093-7>

36. Peterson V.M., Zhang K.X., Kumar N., Wong J., Li L., Wilson D.C., Moore R., et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells. *Nat. Biotechnol.* 2017; 35(10): 936-9. DOI: <http://doi.org/10.1038/nbt.3973>
37. Ramani V., Deng X., Qiu R., Gunderson K.L., Steemers F.J., Distech C.M., et al. Massively multiplex single-cell Hi-C. *Nat. Methods.* 2017; 14(3): 263-6. DOI: <http://doi.org/10.1038/nmeth.4155>
38. Tóth E.N., Lohith A., Mondal M., Guo J., Fukamizu A., Pourmand N. Single-cell nanobiopsy reveals compartmentalization of mRNAs within neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 2018; 293(13): 4940-51. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M117.800763>
39. Hong-Geller E., Micheva-Viteva S.N. Targeting bacterial persistence to develop therapeutics against infectious disease. DOI: <http://doi.org/10.5772/59404> Available at: <https://www.intechopen.com/books/drug-discovery-and-development-from-molecules-to-medicine/targeting-bacterial-persistence-to-develop-therapeutics-against-infectious-disease>
40. Lin J.M., eds. *Microfluidics for Single-Cell Analysis*. Beijing, China: Springer Singapore; 2019. DOI: <http://doi.org/10.1007/978-981-32-9729-6>
41. Michiels J.E., van den Bergh B., Verstraeten N., Michiels J. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug. Resist. Updat.* 2016; 29: 76-89. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.drup.2016.10.002>
42. Tian C., Semsey S., Mitarai N. Synchronized switching of multiple toxin-antitoxin modules by (p)ppGpp fluctuation. *Nucleic Acids. Res.* 2017; 45(14): 8180-9. DOI: <http://doi.org/10.1093/nar/gkx552>
43. Svenningsen M.S., Veress A., Harms A., Mitarai N., Semsey S. Birth and resuscitation of (p)ppGpp induced antibiotic tolerant persister cells. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 6056. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-019-42403-7>
44. Wood T.K. Combatting bacterial persister cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2016; 113(3): 476-83. DOI: <http://doi.org/10.1002/bit.25721>
45. Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell.* 2013; 154(5): 1140-50. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.048>
46. Manav M.C., Beljantseva J., Bojer M.S., Tenson T., Ingmer H., Haurlyuk V., et al. Structural basis for (p)ppGpp synthesis by the *Staphylococcus aureus* small alarmone synthetase RelP. *J. Biol. Chem.* 2018; 293(9): 3254-64. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001374>
47. Syal K., Flentie K., Bhardwaj N., Maiti K., Jayaraman N., Stallings C.L., et al. Synthetic (p)ppGpp analogue is an inhibitor of stringent response in mycobacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2017; 61(6): e00443-17. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.00443-17>
48. Haurlyuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5): 298-09. DOI: <http://doi.org/10.1038/nrmicro3448>
49. Ogura T., Hiraga S. Mini-F plasmid genes that couples host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80(15): 4784-8. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4784>
50. Page R., Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* 2016; 12(4): 208-14. DOI: <http://doi.org/10.1038/nchembio.2044>
51. van Melderen L. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr. Opin. Microbiol.* 2010; 13(6): 781-5. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.006>
52. Lee K.Y., Lee B.J. Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria. *Toxins.* 2016; 8(10): 305. DOI: <http://doi.org/10.3390/toxins8100305>
53. Maleki A., Ghafourian S., Pakzad I., Badakhsh B., Sadeghifard N. MazE antitoxin of toxin-antitoxin system and fbpA as reliable targets to eradication of *Neisseria meningitidis*. *Curr. Pharm. Des.* 2018; 24(11): 1204-10. DOI: <http://doi.org/10.2174/1381612824666171213094730>
54. Cui P., Xu T., Zhang W.H., Zhang Y. Molecular mechanisms of bacterial persistence and phenotypic antibiotic resistance. *Yi Chuan.* 2016; 38(10): 859-71. DOI: <http://doi.org/10.16288/j.yczs.16-213>
55. Chowdhury N., Wood T.L., Martínez-Vázquez M., García-Contreras R., Wood T.K. DNA-crosslinker cisplatin eradicates bacterial persister cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2016; 113(9): 1984-92. DOI: <http://doi.org/10.1002/bit.25963>
56. Conlon B.P., Nakayasu E.S., Fleck L.E., LaFleur M.D., Isabella V.M., Coleman K., et al. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature.* 2013; 503(7476): 365-70. DOI: <http://doi.org/10.1038/nature12790>
57. Równicki M., Pieńko T., Czarnecki J., Kolanowska M., Bartosik D., Trylska J. Artificial activation of *Escherichia coli* mazEF and hipBA toxin-antitoxin systems by antisense peptide nucleic acids as an antibacterial strategy. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2870. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02870>

Информация об авторах:

Андрюков Борис Георгиевич[✉] — д.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной микробиологии ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток, Россия; профессор Департамента медицинской биохимии и биофизики Школы биомедицины ФГБОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov_bg@mail.ru

Ляпун Ирина Николаевна — к.б.н., н.с. лаб. молекулярной микробиологии ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>. E-mail: irina-lyapun@list.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Andryukov Boris Georgievich[✉] — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Prof., Department of Medical Biochemistry and Biophysics, School of Biomedicine, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov_bg@mail.ru

Lyapun Irina Nikolaevna — PhD (Med.), researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>. E-mail: irina-lyapun@list.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.