

микроорганизмов в десятки раз меньше по сравнению с их пленочными аналогами [6].

Выводы

1. Исследуемые штаммы *C. albicans* 2924 способны образовывать зрелые биопленки на 4-5 сутки культивирования.

2. Триптофан в концентрации 2000 – 0,2 мкг/мл мкг/мл снижает антимикробную активность доксициклина по отношению к планктонным формам *C. albicans*.

3. Триптофан в концентрации 2000 – 250 мкг/мл по результатам изображений ТЭМ и ХТТ анализа способствуют формированию более плотной биопленки *C. albicans*.

4. Триптофан в концентрации 1000 мкг/мл снижает антимикробную активность доксициклина по отношению к моно- и микстбиопленкам *C. albicans*.

Литература

1. *Candida albicans* – The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection [Electronic resource] / Jasminka Talapko [et al.] // J Fungi (Basel). – 2021. – Vol. 7, iss. 2. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7912069/>. – Date of access: 26.09.2021.

2. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives [Electronic resource] / Christophe d'Enfert [et al.] // FEMS Microbiol Rev. – 2021. – Vol. 45, iss. 3. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8100220/>. – Date of access: 30.09.2021.

3. An Optimized Lock Solution Containing Micafungin, Ethanol and Doxycycline Inhibits *Candida albicans* and Mixed *C. albicans* – *Staphylococcus aureus* Biofilms / L. Lown [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, iss. 17.

4. Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm removal in vitro [Electronic resource] / X. Chen [et al.] // BMC Microbiol. – 2020. – Vol. 20. – Mode of access: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-020-01947-9>. – Date of access: 26.09.2021.

5. Characteristics and influencing factors of amyloid fibers in *S. mutans* biofilm [Electronic resource] / D. Chen [et al.] // AMB Express. – 2019. – Vol. 9, iss. 1. – Mode of access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30820691/>. – Date of access: 29.06.2021.

6. Артюх, Т. В. Особенности резистентности клинических изолятов *E.coli* и *C.albicans* образующих биопленку / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, О. Б. Островская // Вестн. ВГМУ. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 46–54.

ПЕРСИСТЕНЦИЯ КАК МЕХАНИЗМ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Артюх Т.В., Соколова Т.Н., Сидорович Е.А.

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С. И. Гельберга

Актуальность. Бактериальные клетки преодолевают негативное влияние антибиотиков используя возможности механизмов резистентности и персистенции. Явление персистенции было открыто в 1944 г. на заре массового

производства пенициллина, однако по настоящий момент остается в тени резистентности.

Впервые на загадочное явление – отсутствие полной стерилизации пенициллином культуры *S. aureus*, обратила внимание американский микробиолог Gladys L. Hobby (1942). Добавление пенициллина к культуре стафилококков приводило к видимому лизису бактерий, то есть к разрушению их клеточной оболочки и гибели клеток. Однако J.W. Bigger (1944), ирландский врач, посеял лизированную культуру на чашки, на которой выросли колонии выживших клеток. После повторного пересева эти колонии выросли в культуру, которая снова лизировалась в присутствии пенициллина, и вновь формировала небольшую субпопуляцию, которую Биггер назвал «персисторы», чтобы отличить их от уже известных на тот момент резистентных мутантов, которые при воздействии пенициллина не были бы лизированы вовсе.

Открытие феномена персистенции бактериальных клеток и последующее его изучение позволили расширить представление об адаптационных стратегиях микроорганизмов и механизмах сохранения ими патогенного потенциала [1].

Недавние исследования показывают, что формированию индуцированной персистенции способствуют следующие факторы:

- персисторы образуются случайным образом даже без внешних воздействий на популяцию;
- факторы стресса, например, голодание, окислительный, осмотический стресс, повышают долю персисторных клеток в популяции;
- чувство кворума – межклеточное взаимодействие в составе микробных биопленок реализующееся при помощи химических сигнальных молекул, выделяемых клетками в среду – способствует образованию персисторных клеток;
- иммунное взаимодействие между хозяином и патогеном также вызывает образование персисторов;
- питательные вещества, ограниченно проникающие в глубокие слои биоплёнки, стимулируют персисторобразование [2].

Клетки-персисторы представляют собой лишь небольшую часть любой популяции бактерии, в среднем одна клетка-персистор на 100 тысяч обычных.

Клетка, проявляющая свойство персистенции, не имеет специализированных генов или мутаций для защиты от определённого антибиотика, однако у персисторов наблюдается изменение экспрессии генов или активности белков – такое изменение нестойкое и не будет проявляться у потомков этой клетки. Напротив, резистентные клетки всегда сохраняют свое свойство нечувствительности в ряду поколений, так как оно обусловлено изменением генов, а не метаболизма. До воздействия антибиотика клетка-персистор впадает в состояние замедления метаболизма, что позволяет в некоторых случаях предотвратить повреждение клеточной мишени антибиотика (рис. 1).

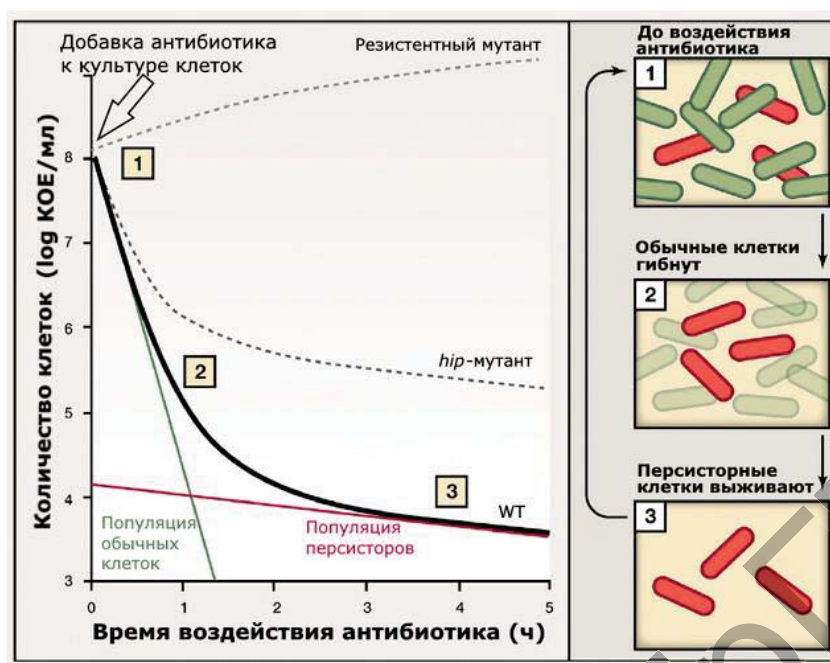


Рисунок 1. – Кривая отмирания при воздействии бактерицидного антибиотика.
При добавлении антибиотика (1) культура резистентного мутанта. Клетки в культуре
нерезистентного штамма дикого типа будут отмирать, притом большая часть погибнет
в самом начале (2) – это популяция обычных клеток. Оставшиеся клетки убывают
гораздо медленнее (3), а часть из них (персисторных) выживает до конца инкубации.
Hip-мутант имеет повышенную частоту образования персистеров [3].

По окончании лечения персисторы могут восстановить активный метаболизм, размножиться и спустя время вновь привести к возобновлению инфекции. При этом потомство персисторных клеток будет состоять из обычных, чувствительных к антибиотикам клеток. Однако среди них снова сформируется небольшая часть клеток, которая обеспечит выживание в дальнейшем [3].

Выявить клетки-персистеры, ответственные за выживание популяции во время воздействия летальных для основной массы клеток факторов, позволяет конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM). С помощью CLSM используя гены-репортеры, кодирующие флуоресцирующие белки, были определены клетки-персистеры, неоднородность бактерий биопленок, а также удалось показать, что интенсивность горизонтального переноса генов в микробных биопленках выше, чем в планктонных культурах [4]. Так же исследования показывают, что штаммы, выделенные от пациентов с длительным носительством, имеют высокий уровень персистеров, тогда как у штаммов от временного носительства уровень не высок, 9% и 0,2% от популяции соответственно [5].

Персистенция является одной из главных причин трудности лечения многих хронических бактериальных инфекций: туберкулеза, рецидивирующих инфекций мочевыводящих путей, брюшного тифа, стафилококковых инфекций и многих других.

Поскольку персисторы нечувствительны ко всем антибиотикам и для их

эрадикации необходима разработка принципиально новых антимикробных стратегий. С целью поиска веществ способных ингибировать персистенцию был проанализирован геном *E. coli*. Оказалось, что способность к персистенции не снижается в значительной степени ни у одного штамма с одиночной делецией. Это указывает на то, что персистенция реализуется при помощи множества различных генов. После получения *hip*-мутанта *E. coli* (от *high persistence*), который проявлял в 100 раз большую частоту образования персистеров, чем родительский штамм, была обнаружена пара генов (*hipA/hipB*), ответственных за процессы персистенции (рис. 1). Данные гены образуют систему токсин-антитоксин (или ТА-модуль). Кроме того, системы токсин-антитоксин имеют множество других функций: поддержание стабильности плазмид, альтруистическая гибель клетки, противодействие распространению бактериофагов, контроль роста клеток. У каждого вида бактерий десятки таких ТА-модулей. Одним из рекордсменов по их количеству является микобактерия туберкулёза. Разработка вещества на основе ингибирования ТА-модулей оказалась неперспективной по причине того, что в геноме каждой бактерии заключено большое количество подобных модулей и найти лекарство, подавляющее сразу несколько является сложной задачей [6].

Позже было обнаружено, что при удалении из хромосомы генов *relA* и *spoT* *hip*-мутант *E. coli* перестаёт производить повышенное количество персистерных клеток. Результаты исследования уровня генной экспрессии методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией показали, что максимальный уровень представленности транскриптов *relA* наблюдается в ранней стационарной фазе, тогда как *spoT* – в поздней стационарной фазе [2]. Гены *relA* и *spoT* кодируют белки алармон синтетазы, которые превращают ГТФ, ГДФ и ГМФ (гуанозинтрифосфат, гуанозиндифосфат и гуанозинмонофосфат) в особые регуляторные молекулы *pppGpp*, *ppGpp* или *pGpp*, в целом обозначаемые *(p)ppGpp*. *(p)ppGpp*-синтетазы бывают двух типов: длинные гомологи *RelA/SpoT* в основном способны и к синтезу, и к гидролизу *(p)ppGpp*, а малые алармон синтетазы – только к синтезу. Еще есть малые алармон гидролазы – они способны только к гидролизу (рис. 2). Эти соединения синтезируются внутри клеток бактерий при неблагоприятных условиях среды (голодание, окислительный стресс, антибиотики и т. д.). Оказалось, что повышение концентрации *(p)ppGpp* в клетке приводит к активации ТА-модулей. Помимо формирования персистентного фенотипа *(p)ppGpp* участвует в стринджент-ответе, но и во множестве других клеточных процессов: адаптации бактерий к стрессу, образовании биоплёнок, контроле скорости роста. У каждого вида бактерий свой набор *(p)ppGpp*-синтезирующих/расщепляющих ферментов [6, 7].

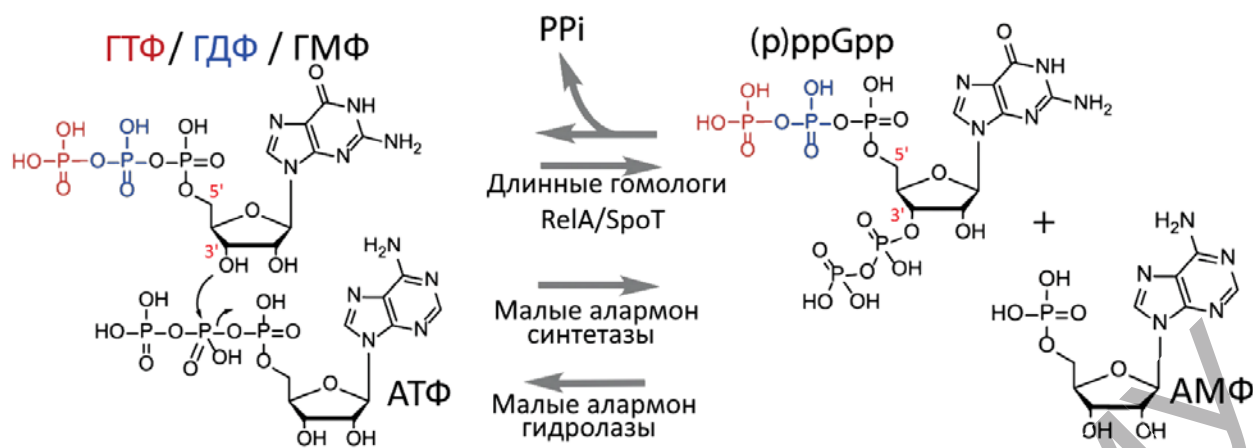


Рисунок 2. – Схема синтеза (p)ppGpp [7].

При удалении у *M. tuberculosis*, гена, ответственного за синтез (p)ppGpp, бактерия теряет способность к долговременному выживанию в условиях стресса и больше не может вызывать латентный туберкулёз. Это было продемонстрировано на модели мышей, заражённых таким штаммом бактерий. Потенциально класс антибиотиков с механизмом действия ингибиторов (p)ppGpp-синтетаз, подавляющий синтез (p)ppGpp может помочь в лечении поздних фаз инфекции и решении проблемы персистенции [7].

Выводы. Механизмы формирования бактериальной персистенции рассматриваются как первый этап в развитии наследственно закрепленных свойств резистентности к антибиотикам. Изучение механизмов устойчивости (персистенции) необходимо для понимания, насколько быстро наличие генетических маркеров антибиотикорезистентности у бактерий становится клинически значимым, каким образом они распространяются в популяции и возможно ли преодолеть резистентность изменением режима применения тех же самых антибиотиков. Результаты исследований анализа генов, ответственных за процессы персистенции, выявляют пути ее преодоления через контроль над (p)ppGpp молекулами и ТА-модулями и, следовательно, в перспективе могут быть использованы для разработки технологии усиления активности традиционных антибиотиков и новых антибактериальных средств.

Литература

1. Андрюков, Б. Г. Молекулярные механизмы персистенции бактерий / Б. Г. Андрюков, И. Н. Ляпун // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2020. – № 3. – С. 271-279.
2. Роль полиаминов в регуляции бактериальной персистенции / А. Г. Ткаченко [и др.] // Вестн. ПФИЦ. – 2020. – № 2. – С. 36-47.
3. Maisonneuve, E. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters / E. Maisonneuve, K. Gerdes // Cell. – 2014. – Vol. 157, № 3. – P. 539-548.
4. Артюх, Т. В. Современные способы исследования микробных биопленок кишечника / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, В. М. Шейбак // Гепатология и гастроэнтерология. – 2021. – Т. 5, № 1. – С. 30-36.
5. Candida species biofilms' antifungal resistance / [Electronic resource] S. Sónia. [et al.] // J Fungi (Basel). – 2017. – Vol. 3, iss. 1. Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715972/>. – Date of access: 20.09.2021.

6. (p)ppGpp and Its Role in Bacterial Persistence: New Challenges [Electronic resource] / O. Pacios [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2020. – Vol. 64, iss. 10. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7508602/#>. – Date of access: 26.08.2021.

7. Molecular mutagenesis of ppGpp: turning a RelA activator into an inhibitor [Electronic resource] / J. Beljantseva [et al.] // Scientific reports. – 2017. – Mode of access: <https://www.nature.com/articles/srep41839>. – Date of access: 26.08.2021.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С МИКОБАКТЕРИОЗОМ ЛЕГКИХ

Богуш Л.С.¹, Скрягина Е.М.¹, Давидовская Е.И.¹, Яцкевич Н.В.¹,
Стринович А.Л.¹, Шаламовский В.В.¹, Дюсьмикеева М.И.¹, Кривошеева Ж.И.²

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии»,
г. Минск, Беларусь

Отдел пульмонологии и хирургических методов лечения болезней органов дыхания

²Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
Кафедра фтизиопульмонологии

Актуальность. В последнее десятилетие во многих странах, в т.ч. и в Республике Беларусь, отмечается рост частоты выделения нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) и количества пациентов с микобактериозом легких (МЛ) в десятки раз [1]. Так, согласно результатам мониторинга распространения и видовой принадлежности НТМБ, проведенного в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии» за период с 2018 по 2019 гг., было выделено 1282 культуры НТМБ от 616 пациентов с признаками поражения легочной ткани воспалительного и деструктивного характера [1, 2]. Очевидно, что пульмонологи и фтизиатры в нашей стране все чаще сталкиваются с необходимостью лечения пациентов с МЛ. Актуальность проблемы лечения пациентов с МЛ обусловлена видовым разнообразием клинически значимых НТМБ, их природной резистентностью к антибактериальным лекарственным средствам, применяемым при лечении, продолжительностью лечения минимум 12 месяцев [3]. Согласно результатам идентификации выделенных из мокроты культур НТМБ за период 2018–2019 гг. получено 11 клинически значимых видов микобактерий, в т.ч. 7 видов медленнорастущих (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. goodii*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. celatum*) и 4 вида быстро растущих (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*) [1, 2].

В республике, как и во всем мире, нет единых подходов к лечению пациентов с МЛ. Сегодня исследователи определяют лечение пациентов с МЛ как сложную задачу и признают эффективность терапии крайне низкой (для МЛ, вызванных *M. abscessus*, не более 30–50%, для МЛ, вызванных представителями МАС-комплекса – 50–70%). Ведущие эксперты в области респираторной медицины однозначно указывают на то, что при ведении пациентов с МЛ необходимо принимать во внимание ряд факторов как со