

БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И ФЕНОМЕН ПЕРСИСТЕНЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Борисова Мария Игоревна¹, Лазакович Дмитрий Николаевич¹, Сидорова Наталья
Анатольевна¹, Савушкин Андрей Иванович²**

¹ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

² Филиал ФГБУ «Госсорткомиссия» по Республике Карелия и Мурманской области,
Петрозаводск, Россия

Сидорова Н.А.

185910 Россия, Республика Карелия, Петрозаводск, пр. Ленина, 33

E-mail: vanlis@petrsu.ru

Аннотация. В статье рассмотрены современные представления о структуре и механизмах формирования биопленки – особой формы организации условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, участвующих в возникновении и развитии заболеваний как инфекционной, так и соматической этиологии. На примере биопленкообразующей активности *Staphylococcus aureus* рассмотрен феномен толерантности микроорганизма, опосредованной SasG-белком, и способность микроорганизмов к формированию популяций клеток-персистеров.

Ключевые слова: биоплёнка, персистер, TA-модуль, *Staphylococcus aureus*, клинические проявления.

BIOFILM-FORMING ACTIVITY AND THE PHENOMENON OF PERSISTENCE IN MICROORGANISMS

Marya I. Borisova¹, Dmitry N. Lazakovich¹, Natalya A. Sidorova¹, Andrey I. Savushkin²

¹Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

²The Karelian Republic Branch of «Gosortkomissiya», Petrozavodsk, Russia

N.A. Sidorova

33, Lenin str., Petrozavodsk, Russia 185910

E-mail: vanlis@petsu.ru

Abstract. The paper dwells on modern ideas of biofilm structure and mechanisms of its formation. Biofilm is a special form of microflora organization in conditionally pathogenic and pathogenic microorganisms involved in emergence and development of diseases of both infectious and somatic etiology. Taking the biofilm-forming activity of *Staphylococcus aureus* as an example, the phenomenon of microorganisms tolerance mediated by SasG-protein and the ability of microorganisms to form persister cell populations is considered.

Keywords: biofilms, persisters, TA-system, *Staphylococcus aureus*, clinical manifestations.

Введение

На протяжении многих столетий ученые исследовали микробные популяции и механизмы их формирования, и только в конце прошлого века столкнулись с особой формой организации бактериальных культур – сообществом микроорганизмов, способных колонизировать объекты окружающей среды и существовать не только в виде микропланктона, но и специфически организованных биоплёнок. Биоплёнки – подвижные, постоянно изменяющиеся гетерогенные сообщества (Чеботарь, 2012), которые могут быть образованы бактериями одного или нескольких видов и состоять как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся или некультивируемых. Формирование подобных высокоспециализированных сообществ – одна из основных стратегий выживания бактериальных культур не только в окружающей среде, но и в организме человека. В целом, биоплёнки представляют собой группу микробных клеток, окруженных толстым, состоящим из высокомолекулярных веществ слизистым слоем.

Механизм формирования биоплёнок

Обычно микроорганизмы существуют в виде свободно плавающих масс или единичных колоний, но некоторые представители бактериального царства стремятся прикрепиться к определенному субстрату-поверхности и образовать биоплёнку, механизм образования которой сложен, строго регулируем и включает четыре последовательные стадии.

1 этап: обратимое (первичное) прикрепление к поверхности. Первый этап формирования биопленки характеризуется обратимой адгезией, связанной с действием неспецифических физико-химических сил между молекулами и структурами на поверхности микроорганизмов (элементами клеточной стенки, жгутиков, пилей) и твёрдого субстрата за счёт различных взаимодействий: Ван-дер-Вальсовых, гидрофобных, ионных, электростатических;

2 этап: необратимое прикрепление к поверхности. После адсорбции бактериальная клетка перемещается вдоль поверхности субстрата, прочно связываясь с ним посредством факторов адгезии, а также с помощью неполимерных адгезинов, которые различают структурные элементы поверхностей тканей хозяина – коллаген, эластин, гликопротеины, гиалуроновую кислоту. На этом же этапе, помимо прочного прикрепления к субстрату, происходят: потеря бактериями подвижности, межклеточные взаимодействия, обмен генами между микроорганизмами как одного, так и разных видов.

3 этап: созревание – *maturation 1*. После прочного прикрепления к субстрату и обмена генами прикрепившиеся бактерии начинают синтезировать экзополисахаридный окружающий матрикс, известный как внеклеточное полимерное вещество (*extracellular polymeric substance*), который является предохранительной «слизью» и составляет 85% всей зрелой биопленки (Чеботарь, 2012; Фролова, 2015). Этот матрикс способствует образованию первоначальной биоплёнки из мелких колоний бактерий. Компоненты экзополисахарида варьируют в зависимости от того, какие микроорганизмы являются его частью.

4 этап: рост – *maturation 2*. На данном этапе образуется зрелая биоплёнка, после чего наступает пора вторичных колонизаторов, то есть клеток, которые прикрепляются к бактериям, уже локализованным на поверхности (Афиногенова, 2011).

Зрелые биопленки способны терять единичные фрагменты, которые, распространяясь по макроорганизму, прикрепляются к субстратам и образуют новые биопленки. Кроме того, в зрелых биоплёнках бактерии не делятся, так как окружены плотным матриксом, и сохраняют высокую жизнеспособность.

Формирование биоплёнки происходит достаточно быстро. Присоединение бактерий друг к другу происходит за несколько минут, прочно связанные колонии образуются за 2–4 часа, а выработка внеклеточного полимерного вещества происходит в течение 6–12 часов, после чего бактерии, образующие биоплёнку, становятся в значительной степени

толерантными к антибиотикам, дезинфицирующим веществам, антисептикам. Кроме того, биоплёнки быстро восстанавливаются после механического воздействия (Чеботарь, 2012).

Ультраструктура биоплёнок

Ультраструктура биоплёнок установлена с помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии. Внеклеточный матрикс микробных клеток имеет специфическое строение и образован трёхмерными грибовидными или колонноподобными структурами. Выделяемый на этапе созревания биопленок экзополисахарид представлен двуслойным гетерополисахаридом, универсальным для каждого вида микроорганизмов. Его наружный слой содержит полисахариды в гидратированном состоянии (декстран, гиалуроновую кислоту, целлюлозу), а внутренний наполнен мембранными везикулами, которые способны выступать в роли факторов патогенности (такие везикулы содержат щелочную фосфатазу С, протеазы, лизоцим). Вещества везикул также выполняют функцию лизиса ослабленных бактериальных клеток, фрагменты которых в дальнейшем являются ростовым фактором и источником питания для остальных членов биопленки.

Все составляющие матрикса разделены каналами, по которым осуществляется транспорт питательных веществ, кислорода, а также выделение конечных продуктов метаболизма бактериальных клеток. За образование и сохранение таких транспортных каналов несут ответственность поверхностные структуры – рамнолипиды, состоящие из смеси полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других веществ.

В матриксе биопленки также находится экстрацеллюлярная ДНК, которая участвует в процессах адгезии, межклеточных взаимодействиях и обуславливает специфику существования биопленочных сообществ (Тец, 2012).

Морфология клеток, входящих в состав биоплёнки

С помощью электронной микроскопии установлено, что на начальных этапах формирования биопленки морфология микроорганизмов не меняется (Фролова, 2015). На последующих, более поздних этапах, бактериальные структуры приобретают морфологическую специфику, связанную с прикрепленным состоянием и коллективным сосуществованием. Кроме того, у клеток в составе биоплёнки происходит замена поверхностных структур, увеличивается частота обмена генетическим материалом между особями в сообществе, деформируется ультраструктурная организация.

Свойства и роль в защите бактериальных популяций

Биопленки являются одним из наиболее значимых факторов защиты, существенно повышая толерантность бактерий к стрессовым ситуациям (нехватка кислорода и питательных веществ в условиях голодания), к факторам иммунной системы человеческого организма, к действию внешних условий (антибиотики, дезинфекторы, стерилизация). Такая толерантность способствует приобретению абсолютной резистентности к факторам, которые могли бы уничтожить бактерий, находись они в свободном состоянии.

Защитная роль биопленок заключается в следующих свойствах:

1. Свойство барьера. Биоплёнки предотвращают глубокое проникновение в их матрикс крупных молекул и клеток, вызывающих воспаление, и служат диффузным барьером для маленьких антимикробных агентов;

2. Совокупные защитные свойства. Бактерии (как одного, так и разных видов) способны обмениваться факторами защиты (продуктами метаболизма или генами), то есть осуществлять взаимозащиту. Так, бактерии одного вида, резистентные к действию антибиотиков, могут передавать гены, ответственные за резистентность, бактериям другого вида, к данному антибиотику чувствительным, обеспечивая таким образом повышение их устойчивости к действию фактора;

3. Свойство обмена, обеспечивающее передачу между микроорганизмами, входящими в состав одной биоплёнки, генов и продуктов жизнедеятельности (Чеботарь, 2012; Тец, 2012);

4. Свойство бездействия, то есть образование неподвижных (неактивных, неметаболизирующих, спящих) субпопуляций – ключевое свойство, присущее исключительно биоплёнкам. Для того чтобы антибиотик подействовал на микроорганизм, он должен быть метаболически активным. Поэтому неактивные бактерии в биоплёнках являются наиболее устойчивыми к подобного рода воздействиям (Тец, 2012; Фролова, 2015).

Разнообразие систем регуляции биоплёнкообразования

Клетки в составе межклеточного матрикса обладают «чувством кворума» (*quorum sensing*) – способностью передавать информацию и регулировать свое поведение за счёт секреции сигнальных молекул. Другими словами, это система регуляции, находящаяся внутри биоплёнки. Известно три системы, которые отличаются друг от друга природой аутоиндукторов:

1. Используется преимущественно грамотрицательными бактериями, а в качестве сигнальных молекул выступают ацилированный лактон гомосерина, который связывается с белком-регулятором, взаимодействующим с двумя регуляторными ферментами – люциферазой и гомосерин-лактоно-синтазой. Активация регуляторных белков индуцирует создание микробами кластеров биоплёнки (Тец, 2012; Туркутюков, 2013).

2. Характерна для грамположительных бактерий и функционирует с использованием линейных и циклических форм пептидов, фуранов, лактонов, их производных, секретируемых во внешнюю среду. Одни из них взаимодействуют с мембраносвязывающими сенсорными киназами, которые проводят сигнал через мембрану, другие транспортируются в клетку с помощью пермеаз, где связываются с внутриклеточными рецепторами. Сигнальным механизмом таких систем является каскад фосфорилирования-дефосфорилирования. Информационные молекулы взаимодействуют с двухкомпонентными системами, в состав которых входит сигнальный белок киназа, связанный с мембраной. Киназа определяет информационный пептид, а затем фосфорилирует и активирует белок-регулятор, связывающийся с ДНК и регулирующий транскрипцию. Сигнальные пептиды этой системы закодированы в хромосоме, а рецепторные белки – в плаزمиде. Таким образом, с помощью подобной коммуникации транслоцируются плазмиды, несущие гены устойчивости к антибиотикам, гены гемолизина, бактериоцинов и гены вирулентности.

3. Встречается у всех микроорганизмов, а сигнальные молекулы представлены бутиролактоном, хинолом, гидроксикетонами, люциферазой. У бактерий есть рецепторные сенсорные белки, которые связывают аутоиндукторы, образуя комплекс, взаимодействующий с мембраносвязанной киназой. Киназа фосфорилируется, фосфат переносится на цитоплазматический белок, затем на регуляторный белок, который связывается с ДНК. В дальнейшем происходит активация генов, кодирующих регуляторные РНК, что ведет к прекращению экспрессии компонентов клеточных структур, реализующих внутривидовые межклеточные коммуникации.

Такая сложная система регуляции, основанная на продукции сигнальных молекул-индукторов, осуществляется на разных уровнях воздействия: транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном. Благодаря «чувству кворума» в популяции биоплёнки постоянно происходит два вида селекции – положительная и отрицательная, то есть сохраняются клетки с выгодными свойствами и уничтожаются бактерии с «ненужными» фенотипами (Тец, 2012).

Участие ТА системы (система токсин-антитоксин) в образовании биоплёнки

Говоря о биоплёнках, стоит отметить, что не каждый микроорганизм способен к их образованию. Процесс синтеза экзополисахаридного матрикса обусловлен определенными

факторами. Согласно последним результатам исследования Страсбургского университета им. Луи Пастера можно утверждать, что для образования биоплёнки необходимо наличие специализированного белка. К примеру, для образования сообщества *Staphylococcus aureus* необходимо наличие SasG-белка (в комплексе с Zn^{2+}). SasG-белок представляет собой РНК-связывающий белок, который активизирует:

- 1) рост поверхностных структур бактерий – жгутиков, пилей;
- 2) синтез внеклеточных полисахаридов;
- 3) обеспечивает формирование толерантности.

За секрецию SasG-белка отвечает набор двух или более тесно связанных генов, которые в совокупности кодируют и белок, и соответствующий ему блокатор.

Данная система получила название ТА-модуль. Она локализована в плазмиде. Это достаточно сложная система, которая обеспечивает не только возможность бактерий образовывать биоплёнки, но и обеспечивает ее жизнеспособность в целом. Согласно работе (Yamaguchi, 2011), если дочерняя клетка лишена плазмиды, то нестабильный антитоксин (блокатор), унаследованный с цитоплазмой материнской клетки, разрушается, а стабильный токсичный белок убивает клетку.

Помимо этого, ТА-модуль отвечает за:

1) регуляцию генов: некоторые токсины действуют как общие репрессоры экспрессии генов, в то время как другие более специфичны;

2) контроль роста: как отмечалось, бактериостатические токсины не убивают клетку-хозяина, а ограничивают её рост;

3) устойчивость клетки: в некоторых популяциях бактерий имеется субпопуляция клеток, обладающая устойчивостью к действию множества классов антибиотиков. Субпопуляция контролируется системами токсин-антитоксин. Эти медленно растущие выносливые клетки страхуют популяцию от полного вымирания.

4) программируемую гибель клетки и выживание её «близких родственников» – различный уровень устойчивости клеток популяции к стрессовым условиям, обуславливающий программируемую гибель некоторых клеток, которая предотвращает вымирание всей популяции (погибшая клетка становится источником питания для остальных).

5) противодействие бактериофагам: когда бактериофаг нарушает транскрипцию и трансляцию клеточных белков, активация систем токсин-антитоксин ограничивает репликацию фага.

Клинический аспект изучения биоплёнок

В настоящее время достоверно доказана роль микробных биоплёнок в возникновении и развитии многих инфекционных заболеваний. Это инфекции сердечных клапанов и суставных протезов, инфекции раневых поверхностей. Раны представляют собой идеальный субстрат для микробной контаминации с последующим образованием биоплёнок. Биоплёнки в ране создают среду с определённым микроклиматом, для которого характерно низкое содержание кислорода. Биоплёнки задерживают миграцию и пролиферацию кератиноцитов, ингибируя тем самым защитные иммунные механизмы, а снаружи создают защитный слой, непроницаемый для противомикробных препаратов местного действия (Чеботарь, 2012а).

Характерными биоплёночными инфекционными патологиями являются гингивиты (воспаление десен), стоматиты (воспаление слизистой рта), образование зубного камня. Отиты – наиболее часто встречающаяся отоларингологическая проблема – также сопровождаются образованием биоплёнок, причем не только бактериальных, но и грибковых.

Помимо раневых инфекций, биоплёнки играют роль в хронизации заболеваний мочевыделительной системы, катетер- и имплант-ассоциированных инфекций (катетеры, водители ритма, сердечные клапаны, ортопедические устройства), заболеваний ССС (синуситах, эндокардитах). Иными словами, биоплёнки играют важнейшую роль в

патогенезе широкого спектра как поверхностных, так и глубоких инфекционных заболеваний. Все эти заболевания трудны для лечения, имеют высокую частоту рецидивов и некоторые из них могут явиться причиной летальных исходов.

При подозрении на наличие биоплёнкообразующих микроорганизмов *in vivo* учитываются следующие факторы:

1) отслоение биоплёнок в кровотоке или мочевыводящем тракте может приводить к формированию эмболов;

2) биоплёнки грамотрицательных бактерий могут продуцировать эндотоксин (липополисахарид), что ведет к инфекционно-токсическому шоку и ДВС-синдрому;

3) бактерии в биоплёнках могут обмениваться плазмидами резистентности (передача резистентности от вида к виду);

4) бактерии в биоплёнке не поддаются воздействию иммунной системы хозяина;

5) биопленки могут снижать чувствительность бактерий к антимикробному агенту.

Последние три пункта указывают на то, что биоплёнки обладают высокой резистентностью к антибиотикам. Однако относительно них более уместно употребить термин толерантность. Примером возникновения феномена толерантности может служить SasG-белок *Staphylococcus aureus*. Его биосинтез провоцирует сбой в пострепликационном цикле, при котором нарушается функционирование бактериального фермента гиразы (аналог топоизомеразы-4 у бактерий). Это приводит к возникновению персистеров.

Персистеры – уникальные клетки бактериальных сообществ, которые, обладая тем же набором генов, что и остальные микроорганизмы сообщества, многократно устойчивы к внешним факторам в отличие от окружающих их клеток (Ульянов, 2014). Персистеры отличаются от обычных бактерий своей физиологией: даже в благоприятных условиях они формируют вокруг себя экзополисахаридный матрикс, часто растут гораздо медленнее обычных бактерий, и, как уже было сказано, отличаются высокой резистентностью к внешним факторам. Персистеры составляют небольшую часть бактериального сообщества, но их количество возрастает в стационарной фазе роста. Интересно, что дочерние клетки обладают такой же резистентностью к внешним факторам, как и родительские клетки-персистеры.

Рассмотрим механизм резистентности персистеров. Предположим, что на бактериальную колонию действует внешний фактор – например, антибиотик. Антибиотик ингибирует активность гиразы (топоизомеразы-4), в результате чего в бактериальной клетке возникают двуцепочечные разрывы ДНК, но только в тех участках, где гираза активна, то есть, в районе «репликативной вилки». Если клетки защищены внеклеточным полимерным веществом, и количество таких мест не больше двух-четырех, то клеточные системы защищают бактерию от гибели, восстанавливая повреждения. У обычных быстрорастущих бактериальных клеток подобных разрывов много и ДНК при применении антибиотика деградирует, в то время как ДНК персистеров сохраняется. Действие антибиотиков может быть различным, но они все встречаются с одной и той же проблемой: медленно развивающиеся, хорошо защищённые персистеры менее подвержены стрессу и успевают «законсервироваться», прежде чем им будет нанесен необратимый ущерб.

Приведенная информация не исчерпывает данных об особенностях микробных биоплёнок. Следует отметить, что, несмотря на большой теоретический материал и важность проблемы, остаются нерешёнными вопросы, связанные с биоплёнкообразующей активностью патогенных и условно патогенных микроорганизмов в составе нозокомиальной микрофлоры медицинских стационаров различного профиля. Отсутствуют препараты, обладающие эффективностью против биоплёнок и микрофлоры в составе внеклеточных матриксов, а также средства борьбы со зрелыми биоплёнками. Эта проблема требует дальнейших разработок.

Библиография

1. Yamaguchi Y., Inouye M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology* 2011, 9(11):779-790.
2. Афиногенова А.Г., Доровская Е.Н. Микробные биопленки ран: состояние вопроса // Травмотология и ортопедия. – 2011. – №3. – С.119–125.
3. Балко А.Б., Балко О.И., Авдеева Л.В. Формирование биопленки штаммами *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиологический журнал. – 2013. – №2. – С.50–56.
4. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? // Практическая медицина. – 2011. – №53. – С.7–10.
5. Тец В.В., Тец Г.В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии // Практическая пульмонология. – 2013. – №4. – С. 60–64.
6. Туркутюков В.Б., Ибрагимова Т.Д., Фомин Д.В. Молекулярные особенности морфологии биопленок формируемых штаммами неферментирующих грамотрицательных бактерий // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – №4. – С.44–47.
7. Ульянов В.Ю., Определенцева С.В., Швиденко И.Г., Норкин И.А., Коршунов Г.В., Гладкова Е.В. Биологическая кинетика биопленок клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у больных с бронхолегочными осложнениями при травматической болезни спинного мозга // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №8. – С.43–47.
8. Фролова Я.Н. Биологические свойства биопленок токсигенных штаммов *Corynebacterium Diphtheriae gravis* ТОХ + : дис. ... канд.биол.наук: 12.06.2015 / Фролова Яна Николаевна. – Ростов, 2015. – 118 с.
9. Чеботарь И.В. Механизм антибиопленочного иммунитета // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т.67. – №12. – С.22–29.
10. Чеботарь И.В., Кончалова Е.Д., Бугрова М.Л. Везикулярные структуры в системе «Нейтрофил – Биопленка *Staphylococcus aureus*» // Инфекционная иммунология. – 2012а. – №61. – С.35–39.