

# ВРЕМЕННО СПЯЩИЕ: КАК БАКТЕРИИ СКРЫВАЮТСЯ ОТ АНТИБИОТИКОВ

**В** последние десятилетия проблема устойчивости бактерий к антибиотикам стала очень острой. Однако на фоне пандемии коронавируса интерес к этой теме несколько упал, хотя ситуация с антибиотикорезистентностью лишь усложняется: бактерии, которые приобретают устойчивость к одному антибиотику, зачастую становятся резистентными и к другим антибиотикам того же класса.

Сейчас поиск новых классов антибактериальных препаратов сильно замедлился. В предыдущие 15 лет был введён в практику лишь один новый класс антибиотиков, и то против грамположительных бактерий, а новый класс антибиотиков широкого спектра действия последний раз был открыт ещё в 60-е годы прошлого века. Разработка новых антибактериальных препаратов стала попросту невыгодна, поскольку на их поиск тратится уйма времени и денег, тогда как потерять эффективность они могут всего за пару лет.

Но даже если удастся открыть «абсолютный» антибиотик, к которому не будет вырабатываться резистентность, бактерии всё равно периодически смогут избегать его действия, просто входя в метаболически неактивное состояние. Такое состояние называется персистенцией (от англ. «persistent» — устойчивый).

## ВЕРНУТЬСЯ К ЖИЗНИ

В 1942 году двое учёных — американский микробиолог Глэдис Хобби и ирландский врач Джозеф Биггер — независимо друг от друга заметили рост убитой пенициллином культуры *Staphylococcus aureus* после пересева на новую среду без антибиотика. То есть после обработки пенициллином бактериальные клетки разрушались, но после пересева на чистую среду культура, которая должна была погибнуть, вновь образовывала колонии благодаря небольшой популяции выживших, но не обладающих резистентностью клеток. Иными словами, некоторые клетки

входили в такое состояние, в котором пенициллин их не убивал, а затем выходили из него и размножались. Однако после новой обработки пенициллином образовавшаяся культура опять погибала.

Феномен персистенции имеет совершенно другие механизмы, нежели устойчивость бактерий к антимикробным препаратам. Персистенция — это неспецифический механизм, то есть способ защиты от большого количества разнообразных повреждающих факторов. Она может активироваться спонтанно или в ответ на различные стрессовые факторы окружающей среды.

Резистентность же вырабатывается против конкретного антибиотика. Возникает она благодаря случайным мутациям бактериальной клетки, приводящим к модификации мишени антибиотика, инактивации самого антибиотика или более активному его выбросу из бактериальной клетки. Резистентность передаётся по наследству: все потомки такой бактерии смогут жить и размножаться в присутствии антибиотика.

Персистенция — это что-то вроде спящего состояния бактерий. Клетка живёт, но остаётся неактивной, ничего не потребляет и не выделяет, а значит, лишена активных мишеней для действия антибиотиков. Но как только бактерия выходит из такого состояния и начинает делиться, антибиотик вновь способен её уничтожить.

Персистенция свойственна абсолютно всем протестированным на данный момент бактериям, и при благоприятных условиях многие культуры имеют небольшую (1—3%) долю персистеров, биологический смысл которых — сохранение популяции в случае изменения условий окружающей среды. Какие гены участвуют в персистенции, определить бывает трудно. Дело в том, что очень много генов «ответственны» одновременно не только за персистенцию, но и за множество дру-

гих функций, и эти гены нельзя просто удалить и посмотреть, сохранится ли способность клетки персистировать, так как в ней будут нарушены и другие процессы.

Механизмов перехода обычной клетки в метаболически неактивное состояние много, они избыточны и могут дублировать друг друга, что подтверждает важность персистенции в жизни бактерий. На данный момент основным способом входа в персистентное состояние считается активация системы токсин-антитоксин (ТА-система). Токсинами в этом случае выступают стабильные молекулы, которые нарушают такие важные функции клетки, как транскрипция (считывание информации с ДНК) и трансляция (синтез белка). Бактерии синтезируют такие токсины внутри себя для саморегуляции, но обычно их нейтрализует антитоксин, образующий с токсином неактивный (то есть не способный вступать ни в какие биохимические реакции) комплекс. Поскольку токсины задерживают клеточный рост и таким образом снижают активность мишеней для антибиотиков, они вносят свой вклад в образование персистеров. Получается, что бактерии могут образовывать меньше антитоксина, в результате чего токсин будет замедлять метаболизм и вводить клетку в неактивное состояние.

Как же исследовать персистенцию, если в её образовании могут принимать участие огромное количество разных токсинов? Для начала исследователи попытались выделить бактерии, образующие персистентные клетки чаще, не-

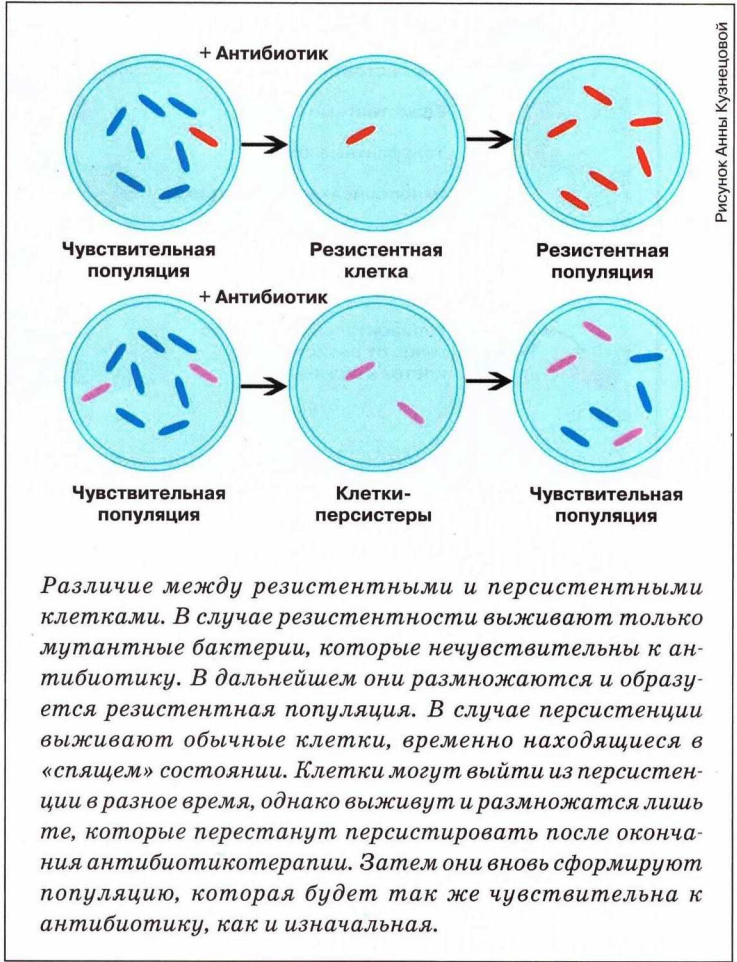
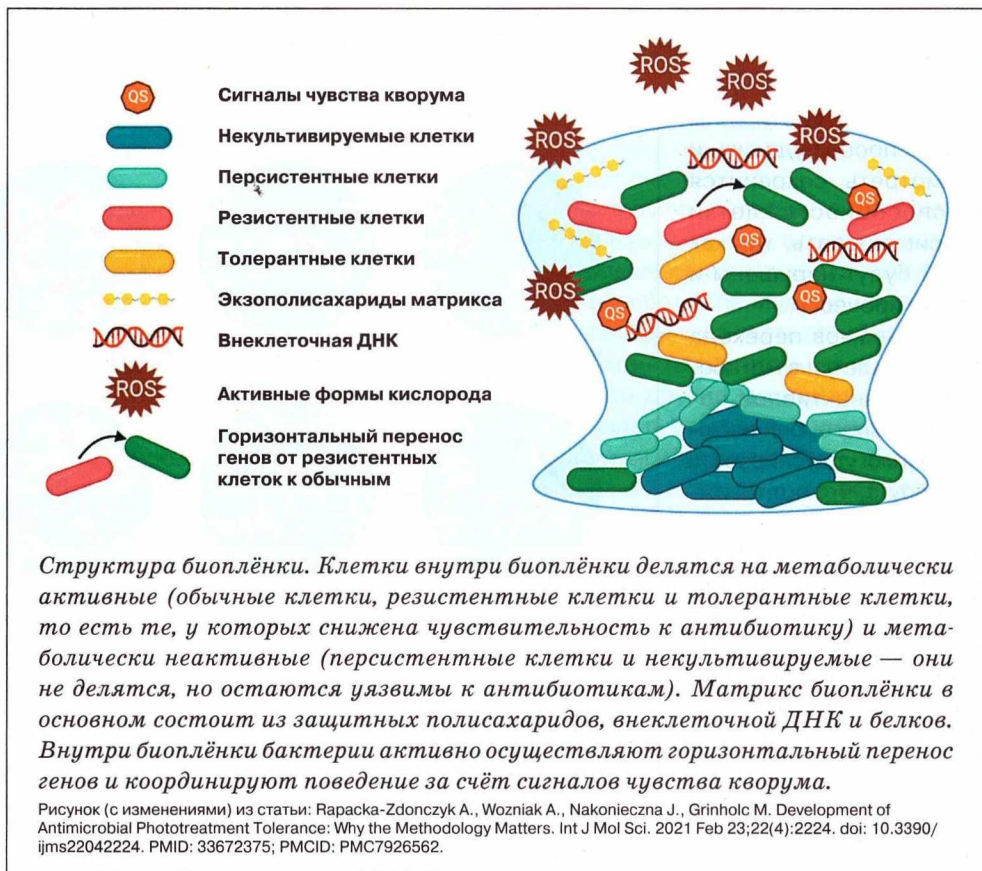


Рисунок Анны Кузнецовой

жели обычная популяция. Это привело к получению *hip*-мутанта *E. coli* (*hip* — сокр. от англ. high persistence) *hipA7*, который проявлял в 100—1000 раз большую частоту образования персистеров, чем родительский штамм. Впервые этот мутант получили Харрис Мойед и Кевин Бертран из Калифорнийского университета, о чём в 1983 году у них вышла статья в «*Journal of Bacteriology*». У обычных бактерий ген *hipA* кодирует токсин, а *hipB* — антитоксин. Но у *hip*-мутантов ген *hipA* мутировал, и продукт больше не обезвреживается антитоксином, что способствует образованию персистентных клеток.

Подобных мутантов стали искать в биологическом материале больных хроническими инфекциями и выделять из



клинических изолятов (то есть из чистой культуры) бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Впоследствии в лабораториях стали получать других мутантов, которые тоже часто образуют персистеры, однако неизвестно, встречаются ли подобные лабораторные мутанты в клинике и не являются ли такие искусственные механизмы повышенного образования персистеров артефактами, и на самом деле в природе не встречающимися.

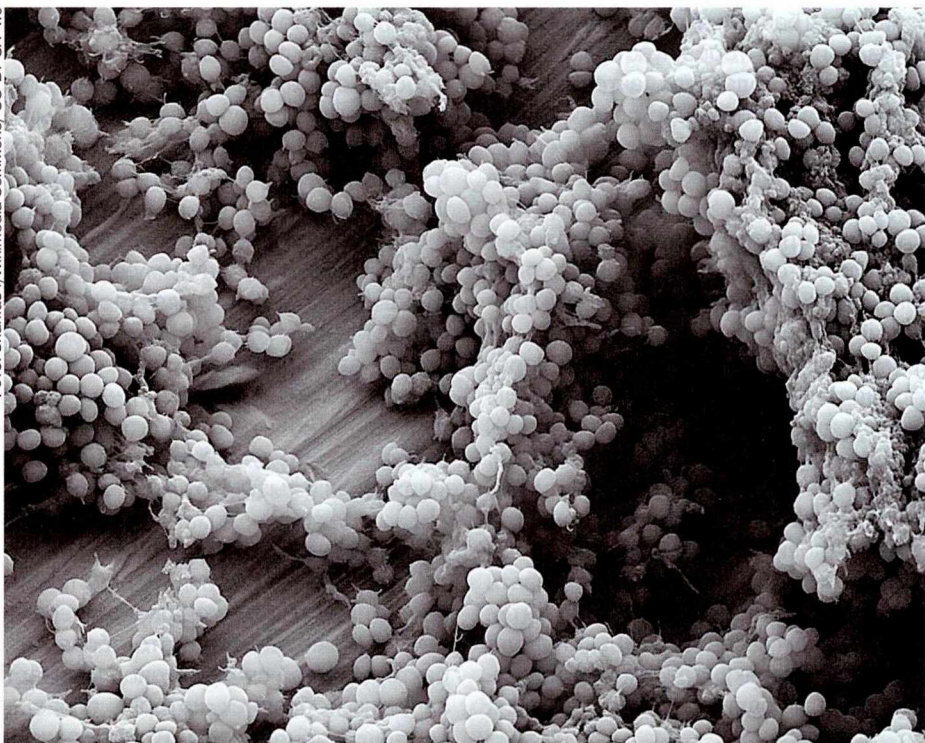
Интересно, что бактерии могут травить токсинами не только себя, но и своих соседей. Клетки внутри бактериальной популяции «общаются» между собой, чтобы координировать общее поведение (это явление называют чувством кворума), выделяя в окружающую среду сигнальные молекулы. Когда в среде

заканчиваются питательные вещества, например глюкоза, клетки *E. coli* могут выделять сигнальную молекулу-токсин. Эти молекулы подавляют синтез ферментов, ответственных за метаболизм глюкозы, и связывают бактериальную РНК-полимеразу\*, останавливая синтез РНК и, впоследствии, белков. Из-за действия этих токсинов бактериальные клетки входят в состояние персистенции, таким образом «выжидая», пока питательные вещества вновь не появятся.

### КОВАРНОЕ СООБЩЕСТВО

Самая распространённая форма существования бактерий — биоплёнка. Внутри биоплёнки клетки находятся в общем матриксе — межклеточном веществе, окружающем бактерии. Матрикс защищает бактериальные клетки от воздействий внешней среды, таких как высокая температура, обнаружение клетками иммунной системы или даже воздействие

\* РНК-полимераза — фермент, осуществляющий синтез РНК.



Так выглядит биоплёнка бактерий *Staphylococcus epidermidis* под электронным микроскопом.

антибиотиков. Однако слоистая структура биоплёнки и плотный полисахаридный матрикс приводят к тому, что в глубоких её слоях бактериальным клеткам ограничен доступ к питательным веществам и кислороду, из-за чего их рост замедляется. Бактерии начинают тормозить свой метаболизм, и доля персистеров в популяции увеличивается. По большей части именно поэтому биоплёночные инфекции с трудом поддаются лечению и часто рецидивируют.

Физическая структура биоплёнок защищает бактериальное сообщество от иммунного ответа, однако к антибиотикам оно уязвимо, поскольку в малом количестве они всё же проникают внутрь.

В современной медицине есть лекарства, действие которых направлено против биоплёнок. Одна из самых многообещающих стратегий состоит в подавлении бактериального общения — системы чувства кворума, о которой мы уже

упоминали выше. Ингибиторы сигнала чувства кворума нарушают архитектуру биоплёнки, из-за чего она может стать для антибиотиков более проницаемой. Это направление исследований получило широкое распространение, поскольку подавлять чувство кворума можно на разных этапах: на фазе образования сигнальной молекулы, её распространения или рецепции. Примерами таких ингибиторов чувства кворума могут служить, например, производные фуранона. (Фураноны — вторичные метаболиты красной водоросли *Delisea pulchra*, благодаря которым эти водоросли защищены от бактериального обрастания. Сейчас эти вещества уже синтезируют химически.)

Однако это не единственный способ борьбы с биоплёночными инфекциями. К примеру, в недавних исследованиях было показано, что оксид азота (NO) может быть использован для рассеивания

биоплёнок. Эта сигнальная молекула используется бактериями для общения. В отличие от ингибиторов чувства кворума эта молекула не подавляет бактериальное общение, а вносит в него помехи, «обманывая» клетки — её наличие в среде сигнализирует им о выходе из состояния биоплёнки. Такой же эффект вызывают некоторые ферменты, которые бактерии используют, чтобы разрушать часть биоплёнки и выходить из неё для колонизации новых мест обитания.

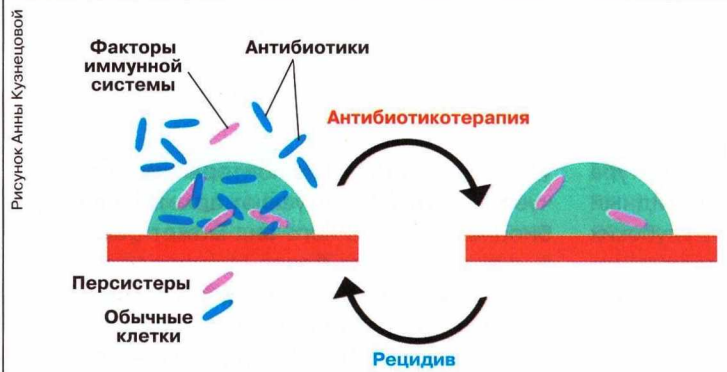
Кроме того, существуют методы борьбы, основанные на улучшении систем доставки антибиотика в биоплёнку. К примеру, кларитромицин (антибиотик, широко используемый в медицине) истончает матрикс и изменяет структуру биоплёнки, повышая проникновение в неё других препаратов. Можно использовать смесь кларитромицина и другого антибактериального агента, чтобы сначала атаковать биоплёнку, а затем уничтожить незащищённые бактерии.

Предотвращение образования и разрушение биоплёнок при инфекциях очень важны, поскольку именно они способствуют сохранению персистентных клеток и рецидиву инфекции. Обычные клетки и клетки-персистеры образуются в биоплёнке и выделяются в окружающие ткани и кровоток при рассеивании. Антибиотики уничтожают обычные бактериальные клетки, а иммунная система распознаёт и устраняет оставшиеся клетки-персистеры. Но матрикс биоплёнки защищает персистентные клетки от факторов иммунной системы, и, когда уровень антибиотика падает, персистентные клетки получают возможность размножиться и вызывают рецидив.

### ИЗУЧИТЬ, ЧТОБЫ ПОБЕДИТЬ

Отметим, что помимо персистенции у бактерий есть и другой способ пережить неприятные условия — это образование бактериальной споры. У спор множество защитных оболочек, которые позволяют бактерии выдерживать резкие перепады температур, отсутствие воды и даже вакуум открытого космоса. В такой устойчивой форме бактерия может просуществовать сотни лет, но процесс спорообразования энергозатратен и занимает время, в среднем от 18 до 20 часов. Кроме того, не все бактерии в принципе способны образовывать споры, и персистенция остаётся самым простым способом сохранения жизнеспособности для популяции. В случае встречи популяции с антибиотиком большая часть бактерий погибнет, однако персистентные клетки останутся, что впоследствии даст популяции шанс на выживание.

На данный момент разрабатываются разные стратегии борьбы с пер-



*Схема рецидива инфекции, возникающего в результате образования биоплёнки с персистентными клетками внутри. Благодаря действию антибиотика погибают нормальные бактериальные клетки, находящиеся внутри и вне биоплёнки. Клетки иммунной системы распознают и уничтожают персистентные клетки вне биоплёнки (действие клеток иммунной системы и антибиотиков схематично показано стрелками). Однако персистентные клетки, которые сохранились внутри биоплёнки, для иммунной системы невидимы и не поддаются действию антибиотиков. Поэтому, когда после завершения антибиотикотерапии персистентные клетки переходят в нормальное состояние и начинают размножаться, инфекция возвращается.*

систентными клетками. Это достаточно сложная задача, поскольку такие клетки метаболически неактивны, то есть не осуществляют активный обмен веществ. Однако можно частично выводить их из этого состояния, чтобы предоставить антибиотикам активную мишень. Хотя персистентные клетки лишены практически всех биосинтетических процессов, они способны окислять глюкозу, чтобы поддерживать жизнь. Соответственно, с помощью глюкозы можно стимулировать метаболизм в таких клетках.

Исследования сотрудников Бостонского университета в 2011 году показали, что использование глюкозы или иных простых сахаров в комбинации с антибиотиком гентамицином снижает количество персистеров в культуре клеток кишечной палочки. То есть можно стимулировать метаболизм персистентных клеток настолько, чтобы они оказались уязвимыми к аминогликозидным антибиотикам, нарушающим синтез белка, который и усиливается при расщеплении молекулы глюкозы. Но у такого подхода есть ограничения. Персистеры могут образовываться разными путями и иметь разную мета-

болическую активность даже в пределах потомков одной клетки, соответственно, этот подход может оказаться эффективным лишь против некоторых персистентных клеток, а не против всех. Кроме того, как уже упоминалось, для медицины наиболее актуально уничтожение персистентных клеток внутри биоплёнки, куда доставка лекарственных средств сильно затруднена.

К сожалению, до сих пор в клинической практике не используется ни один препарат, который был бы нацелен на персистентные клетки. Тем не менее персистентные клетки не обязательно уничтожать, если мы хотим избежать рецидива инфекции. Эту работу можно предоставить иммунной системе, для чего достаточно уничтожить биоплёнку, скрывающую персистеров. В любом случае изучение механизмов персистенции приблизит нас к решению проблемы хронических инфекций и принесёт новые знания о том, как живут и выживают бактерии.

**Алексей ДУКАТ, Анна КУЗНЕЦОВА,**  
биологический факультет  
МГУ им. М. В. Ломоносова.

## ● ВЕСТИ ИЗ ЛАБОРАТОРИЙ

### КУДА ПЛЫВЁТ ПЛАСТИК В ЧЁРНОМ МОРЕ?

С каждым годом в мире производится всё больше пластика. Если такие темпы сохранятся в ближайшем будущем, то, согласно расчётам учёных из Калифорнийского университета, к 2050 году общее количество пластика, произведённого человечеством за всё время, приблизится к 34 млрд тонн. Из которых чуть меньше половины к тому времени превратится в отходы. Загрязнение пластиком окружающей среды, в первую

очередь водных экосистем, — серьёзная и пока не очень решаемая проблема. Наиболее опасен нано- и микропластик, который в морской среде образуется из более крупных частиц пластмассы в результате различных физических, химических и биологических процессов. По мере разложения пластика его экологическое и токсическое воздействие становится оценивать всё сложнее. Из-за того, что крошечные фрагменты полимерных

материалов имеют размеры, сравнимые с фито- и зоопланктоном, они легко оказываются в пищеварительном тракте морских обитателей. У животных может появляться ложное чувство сытости, закупорка пищеварительной системы, кроме того снижается их подвижность и замедляется рост. Разлагающиеся частицы пластика также служат источниками токсических веществ, которые могут накапливаться в тканях морских организмов.

Проблема загрязнения пластиком не обошла и Чёрное море, чему способствуют высокий сток