

16. Rodríguez-Blanco A., Lemos M., Osorio C. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2619–26.
17. Burrus V. Significance of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements in *Vibrio cholerae*. In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K. *Epidemiological and molecular aspects on cholera infectious disease*. Springer; 2011: 161–84.
18. Osorio C., Marrero J., Wozniak R. et al. Genomic and functional analysis of ICEPdaSpa1, a fish-pathogen-derived SXT related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid. *J. Bacteriol.* 2008; 190 (9): 3353–61.
19. Pembroke J., Piterina A. A novel ICE in the genome of *Shewanella putrefaciens* W3-18-1: comparison with the SXT/R391 ICE-like elements. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 264 (1): 80–8.
20. Burrus V., Waldor M. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 2004; 155 (5): 376–86.
21. Seth-Smith H., Fookes M., Okoro C. et al. Structure, diversity, and mobility of the *Salmonella* pathogenicity island 7 family of integrative and conjugative elements within *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* 2012; 194(6): 1494–504.
22. Ghinet M., Bordeleau E., Beaudin J. et al. Uncovering the prevalence and diversity of integrating conjugative elements in *Actinobacteria*. *Mob. Genet. Elements.* 2012; 2(2): 119–24.
23. Beaber J., Waldor M. Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer. *J. Bacteriol.* 2004; 186 (17): 5945–9.
24. Yokota T., Kuwahara S. Temperature-sensitive R plasmid obtained from naturally isolated drug-resistant *Vibrio cholerae* (biotype El Tor). *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977; 11(1): 13–20.
25. Beaber J., Burrus V., Hochhut B., et al. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 59(12): 2065–70.
26. Hochhut B., Waldor M. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol. Microbiol.* 1999; 32(1): 99–110.
27. Marrero J., Waldor M. Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer. *Dev. Cell.* 2005; 8(6): 963–70.
28. Ramamurthy T., Garg S., Sharma R. et al. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet.* 1993; 341(8846): 703–4.
29. Beaber J., Hochhut B., Waldor M. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature.* 2004; 427(6969): 72–4.
30. Beaber J., Hochhut B., Waldor M. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2002; 184(15): 4259–69.
31. Bordeleau E., Brouillette E., Robichaud N., Burrus V. Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* 2010; 12(2): 510–23.
32. Sherburne C., Lawley T., Gilmour M. et al. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucl. Acids Res.* 2000; 28(10): 2177–86.
33. Garriss G., Waldor M., Burrus V. Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity. *PLoS Genet.* 2009; 5(12): e1000775. doi:10.1371/journal.pgen.1000775.
34. Roberts A., Mullany P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol.* 2009; 17(6): 251–8.
35. Gaillard M., Vallaes T., Vorhölter F. et al. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *J. Bacteriol.* 2006; 188(5): 1999–2013.
36. Moon K., Sonnenburg J., Salyers A. Unexpected effect of a Bacteroides conjugative transposon, CTnDOT, on chromosomal gene expression in its bacterial host. *Mol. Microbiol.* 2007; 64(6): 1562–71.
37. Smyth D., Robinson D. Integrative and sequence characteristics of a novel genetic element, ICE6013, in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(19): 5964–75.
38. Frost L., Leplae R., Summers A., Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3(9): 722–32.
39. Mazel D., Dychinco B., Webb V., Davies J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44(6): 1568–74.

Поступила 27.02.14
Received 27.02.14

CONJUGATIVE INTEGRATIVE ELEMENTS (ICEs) OF MICROORGANISMS

Zakharova I. B., Viktorov D. V.

Volgograd Anti-Plague Research Institute, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Volgograd, Russia

Integrative conjugative elements (ICEs) are an extensive group of mobile genetic elements found in the Gram-positive and Gram-negative bacteria. These genetic elements are replicated being incorporated into host chromosome, but retain the ability for excision and conjugative transfer. Given a set of the genes of the conjugative transfer, control of removal and integration, ICEs are directly involved in the processes of horizontal transfer of genetic determinants, which increase the adaptive potential of the bacterial species, as well as act as a mobilizing factor for other genetic elements.

Key words: *integrative conjugative elements; ICE; horizontal genetic transfer.*

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 579.862.1579.252

Маянский А.Н.¹, Чеботарь И.В.², Лазарева А.В.², Маянский Н.А.²

ПНЕВМОКОККОВЫЕ БИОПЛЕНКИ

¹ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, 603005, Нижний Новгород, Россия; ²ФГБУ «Научный центр здоровья детей» РАМН, 119991, Москва, Россия

Обзор посвящен обсуждению биопленочного процесса у пневмококков. Подчеркивается сложность изучения проблемы *in vitro*, которая связана со склонностью всех стрептококков к феномену генетической трансформации, когда значительная часть некомпетентных клеток подвергается разрушению. Показано, что практически все дикие штаммы пневмококка способны к формированию биопленок в том или ином масштабе. Наличие капсулы угнетает образование биопленок, и способность к их формированию имеет обратную зависимость с количеством капсульного материала.

Подчеркивается различие между фенотипом колоний инвазивных штаммов пневмококка и штаммов, обеспечивающих его персистенцию в носоглотке. Анализируется ряд вопросов, связанных с эффекторными и регуляторными факторами биопленочного пневмококкового процесса. Главным выводом, который следует из обзора, является положение о том, что биопленка необходима пневмококку лишь на стадии хронической персистенции.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae; биопленка; пневмококковые инфекции.*

Для корреспонденции: Маянский Николай Андреевич, e-mail: mayansky@nczd.ru.

Streptococcus pneumoniae (далее пневмококк) является одним из ведущих возбудителей среднего отита, пневмонии, сепсиса и менингита (прежде всего у детей). Принято считать, что глав-

ным фактором вирулентности пневмококков является капсула, хотя по-прежнему неясно, почему из всех капсульных серотипов (а их насчитывается более 90) лишь 15–20 являются причиной инвазивных пневмококковых инфекций. Это, вероятно, говорит о том, что не все известно о вирулентных факторах пневмококка, о его протективных антигенах и их взаимоотношениях с хозяином. Становится все более очевидной генетическая неоднородность пневмококков, которая обеспечивает клоносpezifичность, играющую важную роль в их неодинаковой болезнетворности. Первая атака начинается с носоглотки, куда пневмококки попадают аэрозольным путем и надолго задерживаются здесь. Организм обязан постоянно защищать себя от вирулентных пневмококковых клонов, которые неизбежно возникают в процессе генетических (мутационных и трансформационных) изменений, которые столь характерны для стрептококков. Неслучайно еще в 1982 г. мы показали, что одно из первых мест в спектре антител, выявляемых в нормальном иммуноглобулине человека, принадлежит пневмококку [1].

Пневмококки принадлежат к бактериям, которые постоянно встречаются в носоглотке здоровых людей, являясь представителем их факультативной нормальной микрофлоры. Нормальную микрофлору можно считать хронической инфекцией, которая в некоторых случаях дает обострения в виде различных инфекционных заболеваний. Ее сдерживают специфические и неспецифические эффекторы иммунитета, о чем говорит наличие антител к поверхностным и внутренним бактериальным антигенам, большинство из которых представлено антителами к грамположительным коккам (пневмококку, пиогенному стрептококку, золотистому стафилококку) [1]. После того как стало понятно, что бактерии в живой природе существуют в виде биологически активных конгломератов, получивших название биопленок, этому феномену уделяется повышенное внимание, прежде всего с позиций хронических инфекций [2]. Необходимо понять, какие факторы способствуют формированию биопленок в организме хозяина и их выживанию в условиях контакта с неблагоприятными условиями существования, когда эффекторы иммунитета и искусственно вводимые антимикробные препараты стремятся избавиться от всего чужеродного, «не своего», попавшего в организм.

Общие представления о формировании пневмококковых биопленок

Биопленку можно считать кластером живых бактерий, которые, располагаясь на интерфазе между различными средами, продуцируют внеклеточное вещество (матрикс), обволакивающее бактериальные клетки. Матрикс предупреждает прямое взаимодействие между бактериями и неспецифическими и специфическими эффекторами иммунитета, действием антиметаболитов, антибактериальных веществ и других факторов, нацеленных на уничтожение микробов. Внутри биопленок бактерии постоянно взаимодействуют между собой, продуцируя факторы межклеточного общения и рецепторы, сигнализирующие об изменениях во внешней среде (свойствах биопленочного субстрата, температуре, аэрации, влажности, антимикробных факторах и пр.). Эти сигналы воспринимаются бактериальными клетками не только пассивно, но и активно, заставляя их «принимать решение» по оказанию помощи всей бактериальной массе, оказавшейся в затруднительном положении. Помощь заключается в том, что в бактериальной популяции возникают клоны (мутанты, сиквенстипы), способные не только к выживанию (приспособлению) в неадекватной для себя среде, но и к проявлению своей потенциальной вирулентности. Такие клоны после отсоединения от биопленки способны провоцировать заболевания, типичные для данного вида бактерий [3–6].

Пневмококки относятся к бактериям, заражение которыми происходит воздушно-капельным путем. Они оседают на слизистой оболочке носоглотки, здесь же происходит их адгезия, а затем и колонизация. Полагают, что бактерии, колонизирующие носоглотку, способны к образованию биопленки. Это справедливо и для пневмококка. Практически все изоляты пневмококка (как инвазивные, так и носоглоточные штаммы) способны к продукции биопленок того или иного масштаба *in vitro* [5, 7–9]. Не обнаружено зависимости между серотипом и клонотипом штаммов и их способностью к биопленочному процессу, хотя заме-

чено, что антибиотикочувствительные штаммы образуют более толстую биопленку, чем резистентные штаммы [10]. Более того, как образующие, так и не образующие раннюю биопленку на абиогенных субстратах клоны могут принадлежать к одному и тому же серотипу [11]. Результаты попыток выяснить факторы, от которых зависит биопленочный фенотип пневмококка, показаны ниже.

Но прежде следует определиться с такими понятиями, как адгезия, колонизация и формирование биопленок. Адгезия бывает первичной, когда она связана с внешними бактериальными факторами, всегда присутствующими на покоящихся бактериях и обладающими способностью к адсорбционному взаимодействию с биогенными или абиогенными субстратами, которые могут стать основой для развития биопленки. Вслед за первичной адгезией бактерии вступают в лаг-фазу и готовятся к усиленному размножению. При этом на их поверхности экспрессируются новые компоненты с функциями вторичных адгезинов. Они обладают способностью к взаимодействию с другими бактериальными клетками того же или иного вида и образованию многоклеточных кластеров, или микроколоний. Этот процесс напоминает события, происходящие при культивировании бактерий на плотных питательных средах *in vitro*. Адгезия плюс размножение бактерий и составляют бактериальную колонизацию. Вслед за этим бактерии секретируют (пассивно или активно) новые продукты, которые служат прикрытием от неблагоприятных факторов окружающей среды и называются биопленочным матриксом. Матрикс пневмококковых биопленок аналогичен тому, что строят для себя и другие бактерии. Он состоит из белков, некапсульных полисахаридов и ДНК. Присутствие в среде ДНК-азы I, трипсина или протеазы K подавляет образование ранней биопленки пневмококка [12]. Точно также действуют эти ферменты на уже сформировавшуюся биопленку [12, 13]. Кроме того, в биопленках выявляют полисахаридные компоненты при помощи флюорохром-меченных лектинов, при обработке NaIO_4 гликозид-гидролазами [14]. Заметим, что добавление гомологичной или гетерологичной ДНК не увеличивает способность пневмококка к биопленочному процессу [12].

С момента образования матрикса бактериальная масса носит название биопленки. В биопленке бактерии находятся в состоянии готовности к стрессу, в чем им помогает сниженная метаболическая активность, коррелирующая с уменьшением проникновения питательных веществ через биопленочный матрикс [15]. Биопленочные бактерии находятся в постоянной динамике, отщепляясь от биопленки в виде отдельных клонов, которые способны распространяться на новые участки тела и вызывать инвазивные (острые) или неинвазивные (хронические) инфекции.

Пневмококковые биопленки, получаемые *in vitro*, можно разделить на ранние (18–24 ч), средней продолжительности (24–72 ч) и поздние (более 72 ч). Биопленки могут быть получены на абиогенных субстратах (например, на полистироновых планшетах) или на поверхности живых клеток, в стационарных условиях или в проточном режиме. Для пневмококка до сих пор проводилось изучение главным образом ранних биопленок на абиогенных (полистироновых) субстратах. Это связано с тем, что при позднем культивировании пневмококки, подобно другим альфа-стрептококкам, включают свойственный им гидролитический механизм «братоубийства» (англ. *fratricide*), который ведет к гибели некомпетентных клеток, оставляя незначительную часть живых бактерий [7, 12, 16]. Лишь в некоторых исследованиях, где использовался проточный метод, удалось сохранить живую биопленку на протяжении 9 дней [7, 16]. Особняком стоит работа L. Marks и соавт. [17]. Для получения биопленки авторы использовали абиогенные носители (покровные стекла) с выращенными на них респираторными клетками (их получали из бронхиальных смывов здоровых людей и бронхиальной мукодермоидной карциномы), которые предварительно убивали параформальдегидом. Это позволяло получать стационарные биопленки (при смене культуральной жидкости через каждые 12 ч) на протяжении 48 ч. Как и во всех предыдущих исследованиях, авторы показали, что штаммы пневмококка (независимо от капсульного серотипа) образуют различную по мощности и чувствительности к антибиотикам биопленку. Это лучше всего проявлялось в средней по длительности (48-часовой) стадии

био пленочного процесса. Биопленки мутантов, лишенных способности к образованию адгезивных факторов (см. ниже), выглядели гораздо слабее, чем биопленки нативных штаммов, и были значительно чувствительнее к гентамицину, по-видимому, из-за недостаточного прикрития матриксом.

Способность к био пленочному процессу наиболее характерна для неинвазивных пневмококковых штаммов (клонов), склонных к местной инфекции. Такие клоны инфицируют носоглотку аэрозольным путем, задерживаясь здесь более или менее длительно в виде биопленки [18]. Отсюда происходит постоянный сброс пневмококков с одновременной трансформацией их в планктонные формы. Высвобождающиеся из биопленки планктонные пневмококки являются генетически неоднородными и представлены клонами с различным потенциалом: некоторые из них способны поддерживать местный био пленочный фенотип, а другие (клоны с наиболее выраженной вирулентностью) проявляют свои инвазивные свойства. Согласно данной гипотезе, пневмококковая инфекция протекает в виде двух вариантов. Один вариант предполагает участие клонов неинвазивного био пленочного фенотипа (они обеспечивают хроническую инфекцию носоглотки), другой связан с клонами инвазивных пневмококков, которые наделены малой био пленочной активностью, но обладают значительной способностью к образованию капсулы и другими вирулентными качествами [19, 20]. Биопленка нужна пневмококку для долгосрочного выживания в носоглотке и трансмиссии к новому хозяину. Она не предназначена для инвазивных процессов, к которым не готово большинство клонов пневмококков, вычленившихся из биопленки.

Согласно этой схеме, развитие системной инвазивной пневмококковой инфекции должно включать в себя формирование хронической (или субхронической) био пленочной нормоинфекции в носоглотке, возникновение в ней клонов с различным генотипом, селекцию клонов с максимальным инвазивным (вирулентным) фенотипом, проникновение таких клонов в легкие и далее в кровь с развитием пневмококкового сепсиса. Но пневмококки способны также и к местной (локальной) инвазии. Клоны носоглоточной биопленки способны проникать на поверхность аденоидов и далее на слизистую оболочку носоглоточных синусов. Кроме того, через евстахиеву трубу они могут попадать в среднее ухо, вызывая средний отит. Во всех этих случаях пневмококковая инфекция сопровождается формированием биопленок. Об этом свидетельствует обнаружение биопленок пневмококка на поверхности аденоидных и мукозальных эпителиальных клеток в биопсийных образцах, полученных от детей с хроническим средним отитом [6, 21–24]. Наблюдения за моделью *in vivo* (на шиншиллах) подтвердили значение биопленок при пневмококковом среднем отите [25]. В то время как био пленочные структуры не были описаны у больных с пневмонией [26], С. Sanchez и соавт. [18] показали, что вирулентный штамм пневмококка серотипа 4 образует биопленку в носоглотке, трахее и легких инфицированных мышей.

Пневмококковые белки, участвующие в формировании биопленок

Протеомный анализ биопленок, продуцируемых в проточном режиме, выявил не только дифференцированную продукцию различных белков, но и существенное увеличение содержания многих из них [27]. М. Allegretti и соавт. [16] отметили значительную гетерогенность зрелых биопленок из различных штаммов, которая не была связана с их серотиповой принадлежностью. Изучение протеома подтвердило наличие различных стадий в 9-дневных биопленках, обнаружив множество фенотипов в процессе их развития. Девятидневные биопленки продуцировали *de novo* более 250 белков по сравнению с 6-дневными биопленками и более 700 новых белков по сравнению с планктонными бактериями. Это говорит о том, что формирование пневмококковой биопленки – более сложный процесс, чем предполагалось ранее. Тем интереснее данные, полученные С. Sanchez и соавт. [20]. Используя 2 штамма пневмококка серотипов 3 и 4, они показали существенные различия между антигенным профилем планктонных и био пленочных бактерий (применяли позднюю проточную 3-дневную биопленку). При изучении взаимодействия бактериальных лизатов и сывороток от реконвалесцентов после пневмококковой пневмонии были получены выраженные антительные реакции лишь с лизатами

планктонных пневмококков. Напротив, сыворотки, полученные у мышей после инфицирования био пленочными пневмококками, давали обратную картину, наиболее активно реагируя с лизатом био пленочных пневмококков.

Значение холинсвязывающих белков для развития биопленок пневмококка (прежде всего это касается адгезивного процесса) изучали на мутантах, у которых была нарушена функция одного из этих белков. Результаты показали, что мутанты по *LytA*-амидазе, *LytC*-лизозиму, *LytB*-глюкозаминидазе, *CbpA*-адгезину и *PspA*-адгезину имеют сниженную способность к образованию биопленок, в то время как для мутантов по *Pse*-фосфохолинэстеразе и по *CbpD*-амидазе не было отмечено снижения способности к образованию биопленок [12]. При изучении способности к образованию биопленок у 69 мутантов с 42 инсерциями в различные гены и их промоторы было обнаружено, что мутанты по *lytC*- или по *cbpA*-генам являются слабыми продуцентами биопленок [8, 27], что согласуется с предыдущими исследованиями [12]. Обнаружен холинсвязывающий белок (SP0391), который требовался для оптимального био пленкообразования, в то время как блокада гена, кодирующего белок SP1538 (пептидилпролин-цис-трансизомераза), приводила к резкому подавлению био пленочного процесса [8]. Интересно, что способность инкапсулированных пневмококков серотипа 2 с мутациями по *SP1538*, *cpbD* или *SP0391* к колонизации носоглотки мышей была значительно снижена [8]. Показано также, что белок SP1538 сверхэкспрессирован в биопленках пневмококка [16]. Двумя другими факторами, вовлеченными в продукцию биопленки, являются *PsrP* (пневмококковый белок, богатый сериновыми повторами) [28] и нейраминидаза *NanA* [29]. Базальный домен *PsrP* (расположенный между аминокислотами 273–341) обеспечивает связывание пневмококка с кератином-10 легочного эпителия (он отсутствует на носоглоточных эпителиоцитах) [28, 30]. Антитела к базальному домену оказывали нейтрализующий эффект на способность пневмококка прикрепляться к легочным эпителиоцитам и проникать в кровь [28].

Роль пневмолизина (*Ply*-фактора) в развитии биопленок пневмококка остается неясной. Как показал анализ с помощью микрочипов, повышение образования пневмолизина регулируется системой *LuxS* [4], которая может существенно влиять на уровень *ply*-транскриптов во время среднелогарифмической фазы роста. Возможно, *Ply*-фактор имеет значение для начальной фазы био пленочного процесса, когда происходит прикрепление бактерий к субстрату. Это тем более вероятно, поскольку пневмолизин не секретируется пневмококком, локализуясь в клеточной стенке [31].

Несмотря на то что все перечисленные факторы могут играть роль в био пленкообразовании, специфический аппарат, при помощи которого пневмококки строят биопленку, остается иллюзорным. Образование биопленки требует суммарного механизма, регулируемого многочисленными внешними сигналами [32]. Эти и другие данные можно анализировать с нескольких позиций. Во-первых, они свидетельствуют о сложном характере реакций, участвующих в адгезивном процессе пневмококков. Выключение хотя бы одного компонента из этого комплекса может повлечь за собой торможение всех реакций, связанных с первичной адгезией и далее – с колонизацией и образованием биопленки [27]. Во-вторых, процесс био пленкообразования находится под контролем межклеточных факторов, которые сигнализируют о необходимости экспрессии одних генов и торможении других генов, решая судьбу бактерий.

Значение пневмококковой капсулы в био пленочном процессе

Первым фактором, от которого зависит экспрессия поверхностных адгезивных белков на бактериальных клетках, является капсула пневмококков [32]. Определенное количество капсульного материала необходимо для образования носоглоточной биопленки. Об этом говорит то, что бескапсульные или малокапсульные варианты пневмококков обладают незначительной способностью к био пленочному процессу или даже лишены ее [32, 33]. Скорее всего, капсула необходима для первичного прикрепления к субстрату. Она блокирует вторичные адгезины, которые появляются тотчас после первичной адгезии. Вероятно, капсульный материал создает физическое препятствие для участия поверхностных бел-

ков в прикрепительных реакциях [21, 28]. Повышенная экспрессия капсулы более типична для инвазивных, чем для мукозальных, клонов пневмококка, которые способны закрепляться на слизистой оболочке носоглотки с образованием биопленки. Снижение продукции капсульного полисахарида усиливает прикрепление пневмококка к клеткам хозяина при носоглоточном носительстве [8, 12, 17]. Этим же можно объяснить особенности биопленочной активности пневмококков серотипа 3. Обычно эти пневмококки формируют обильную капсулу, которая обуславливает слизистый характер колоний, и обладают низкой ранней биопленочной активностью. Напротив, колонии малого немуконидного типа тех же штаммов, которые спонтанно возникают в биопленке, демонстрируют хорошую биопленочную способность и активно прикрепляются к абиогенным субстратам с образованием мощной ранней биопленки [16, 33].

По данным [5], разные серотипы одной капсульной серогруппы (6А и 6В) могут обладать разными возможностями для раннего биопленочного процесса *in vitro*, но одинаково способны колонизировать слизистые *in vivo*, например носоглотку мышей. Это справедливо как для инвазивных штаммов пневмококка, так и для носоглоточных изолятов, выделенных у носителей. Объясняя свои данные, авторы предположили, что неоднородность штаммов при образовании биопленки *in vitro* могла быть связана с разной способностью продуцировать капсулу, задерживающую биопленочный процесс [5].

Фенотипическим свойствам пневмококковых колоний, которые отражают их способность к образованию капсулы и соответственно готовность к биопленочному процессу, уделяется много внимания. Кроме цитированной выше статьи о значении фенотипических (капсульных) свойств пневмококка серотипа 3 в биопленочном процессе [16], отметим ряд других работ, посвященных изучению свойств колоний пневмококка в призматических значениях для образования биопленки *in vitro* и *in vivo*. Фазовые варианты пневмококка представлены главным образом двумя типами колоний – серым/мутным (opaque) и прозрачным (transparent), которые могут спонтанно менять друг друга, играя важную роль в инфекционной патологии [34–37]. Прозрачные колонии имеют тонкую капсулу, склонны к повышенной адгезии, колонизации и биопленочному процессу. С ними связано формирование поверхностных биопленок при носоглоточном носительстве пневмококков. Прозрачные пневмококки лучше прикреплялись к буккальному эпителию, альвеолярным клеткам и сосудистому эндотелию, чем их фазные мутные варианты [18, 38]. Адгезия прозрачных пневмококков к эпителиальным клеткам возрастала после обработки клеточных культур провоспалительными цитокинами (ИЛ-1 и TNF- α), однако прикрепление мутных пневмококков это воздействие не усиливало [38]. Адгезия прозрачных пневмококков соответствовала их взаимодействию с изолированными рецепторами клеток (иммобилизованными GlcNAc и GlcNAc- β 1-3Gal) и клетками, трансфицированными рецептором для фактора, активирующего тромбоциты (PAF-рецепторы) [38]. Для мутных колоний типичным является наличие плотной капсулы, которая защищает пневмококки от опсонизации и уничтожения фагоцитами. Мутный фенотип продуцирует больше капсульного полисахарида и перекиси водорода, чем прозрачные штаммы, и требует для опсонизации в 30 раз больше иммунной сыворотки [39]. Мутные штаммы хуже, чем прозрачные пневмококки, задерживаются на абиогенных и биогенных поверхностях и соответственно образуют менее выраженную биопленку [38]. Они приспособлены для инвазивных реакций, поэтому их выделяют главным образом при пневмониях и пневмококковых септицемиях [3, 35, 39].

Регуляция образования биопленок

Формирование капсулы и фенотипа колоний находится под контролем генетического аппарата бактерий, на который постоянно влияют мутационные или транскрипционные факторы. Их регуляторное воздействие меняет структуру генов, управляющих экспрессией капсульного материала, элементов адгезии и выживания, секрецией биопленочного матрикса и пр., т.е. теми компонентами, которые способствуют персистенции пневмококков, их стабильному существованию в виде носоглоточной биопленки. К таким факторам относят компоненты с двухступенчатой системой регуляции, передающие сигналы на генетический

аппарат бактерий с использованием мембранных рецепторов и внутриклеточных посредников. Таких систем у пневмококков около 30 [40, 41], и некоторые из них имеют отношение к контролю за вирулентными свойствами и биопленочным процессом. Мы приведем здесь несколько примеров, демонстрирующих влияние двухкомпонентных систем на биопленочные процессы пневмококка *in vitro* и *in vivo*.

В составе биопленки бактерии общаются между собой с помощью малых молекул, которые они сами продуцируют, в связи с чем эти субстанции получили название «самоиндукторов» (auto-inducers – AI). К настоящему времени описано несколько классов AI, к наиболее изученным относятся молекулы класса AI-2. Это пептидные медиаторы, которые вовлечены в QS (Quorum Sensing) широкого круга бактериальных видов. В синтезе AI-2 участвует S-рибозилгомоцистеинлиаза (LuxS-протеин), фермент, кодируемый геном *luxS* [26, 44]. Экспрессия *luxS* повышена во всех случаях активации бактерий *in vivo*, включая биопленки [27]. Мутанты по LuxS-протеину персистируют в носоглотке зараженных мышей менее продолжительное время (15 дней), чем родительские штаммы. Вместе с тем они способны проникать из носоглотки в легкие и кровь так же эффективно, как дикие штаммы [4]. По другим данным, полученным с помощью интраназального и внутрибрюшинного инфицирования мышей, мутанты, лишенные гена *luxS*, менее активно проникают в кровь и легкие, т.е. имеют сниженную вирулентность по сравнению с родительским штаммом [42]. Возможно, эти различия связаны с тем, что в отличие от E. Joys и соавт. [4] авторы [42] изучали только начальную (2-дневную) фазу носоглоточной колонизации, а *luxS* важен на более поздней стадии. В похожей работе J. Vidal и соавт. [26] авторы использовали стационарную биопленку на полистироловых планшетах, которую выращивали в течение 10–24 ч. Результаты показали, что LuxS-протеин необходим для образования ранней биопленки. У мутантов по *luxS*-гену обнаружено снижение (до 80%) формирования ранних биопленок. Комплементация мутантных клонов геном *luxS* восстанавливала их способность к биопленочному процессу. Добавление в среду растворимого фактора, секретируемого родительским штаммом, или синтетического AI-2 также восстанавливало биопленочный процесс у мутантных клонов [26]. Другие белки, первоначально задействованные в образовании биопленки, такие как нейраминидаза NanA [29] и холинсвязывающий протеин PspA [12], по-видимому, не участвуют в LuxS-зависимый биопленочный процесс пневмококка. Наряду с этим установлено, что экспрессия гена *hylA*, который кодирует аутолизин, вовлеченный в разрушение клеточной стенки [43] и продукцию биопленки пневмококка [12], усиливается LuxS-протеином во время логарифмической стадии роста бактериальной культуры [26].

По данным, полученным С. Trappetti и соавт. [44], одним из центральных регуляторных узлов, который связывает ген *luxS* пневмококка с его способностью к биопленочному процессу, является внеклеточное железо. Железо (в виде нитрата в концентрациях 10–200 мкМ) резко усиливало образование биопленки диким штаммом, в то время как добавление нитрата железа вместе с ингибитором (дефероксоамином) давало противоположный эффект, т.е. торможение биопленочного процесса. При этом мутанты, лишенные *luxS*, не образовывали биопленки даже после добавления железа, тогда как мутанты с гиперэкспрессией *luxS* интенсивно формировали биопленки в отсутствие железа. Высвобождение ДНК при разрушении некомпетентных бактерий секреторными гидролазами компетентных пневмококков, которая используется ими для построения биопленочного матрикса, также напрямую связано с экспрессией гена *luxS* [44].

В дальнейшем эта работа подверглась существенным экологическим уточнениям [45]. Было замечено, что pH неинфицированной ушной полости находится в пределах 6,5–6,8, тогда как pH крови около 7,4. С учетом этого авторы исследовали образование стационарной 24-часовой биопленки на полистироновых планшетах при pH 6,8 и 7,4 у клинических изолятов пневмококка, выделенных из крови и из полости среднего уха у детей с отитом. Все штаммы относились к серотипу 3, имели идентичный сиквенс-тип, формировали одинаковое количество капсульного материала, но значительно различались по экологическим признакам [45]. Изоляты из крови давали выраженную биопленку только при pH 7,4; ее образование усиливалось, если в среду с pH 7,4 добавляли

50 мкМ Fe[III]. Ушные изоляты образовывали биопленку только при pH 6,8, а добавление железа оказывало подавляющий эффект. Формирование биопленки сопровождалось повышением экспрессии *luxS*-гена, причем наиболее выраженным у инвазивных изолятов. Казалось бы, это говорит о том, что *luxS*-ген играет меньшую роль для ушных штаммов. Однако *luxS*-мутантные ушные штаммы пневмококка продуцировали значительно меньшую биопленку, чем их родительские штаммы. Интраназальное введение инвазивных пневмококков мышам показало, что пневмококки лишены способности формировать персистентную инфекцию в носоглотке, поскольку тотчас проникают через легкие в кровь. Напротив, для ушных изолятов характерна колонизация носоглотки. Отсюда 50% из них проникает в среднее ухо, но они никогда не распространяются в легкие и кровь. Тканевой тропизм и различная вирулентность пневмококковых штаммов, выделенных из различных источников, выдвигают необходимость идентификации дополнительных генов и их вариантов, которые ответственны за особенность клинических изолятов из разных локусов [45].

В регуляции биопленочного процесса *in vivo* и *in vitro* большое значение придается QS-компетентностимулирующему пептиду (CSP; он также принадлежит к двухкомпонентным системам). CSP участвует в формировании популяции компетентных пневмококков, необходимой для генетической трансформации бактерий. Эта популяция обладает гидролитическими ферментами, которые способствуют высвобождению ДНК из некомпетентных бактерий, подлежащей интеграции (рекомбинации) с хромосомой компетентных пневмококков. Кроме того, мутации, нарушающие двухкомпонентную систему ComDE, которая ответственна за передачу сигнала CSP (ComC), которая регулируется секреторным CSP [27, 47]. С. Trappetti и соавт. [47] сообщили о том, что мутант по гену *comC* был неспособен к формированию биопленки, но добавление в среду экзогенного CSP восстанавливало биопленочный фенотип. Показано, что Com-система пневмококка необходима для поздней стадии образования биопленки (>24 ч) в стационарных условиях на полистиреновой основе; добавление CSP к мутантным штаммам пневмококка на ранних сроках было неэффективным [48]. Таким образом, при формировании пневмококковой биопленки предложено различать 2 фазы – раннюю, которая не зависит от генетической системы компетентности (на этой стадии происходит прикрепление бактерий к субстрату), и позднюю (после 8-часовой экспозиции), которая регулируется генами компетентности [47].

При сравнении диких штаммов пневмококка с их мутантами по *comC*- и *luxS*-генам оказалось, что обе QS-системы необходимы для продукции ранних биопленок на биогенных субстратах. Так, Com QS-система участвует в регуляции формирования ранней биопленки пневмококков только на клетках респираторного эпителия человека, на которых пневмококк давал более мощную биопленку, чем на абиогенном (полистиреновом) субстрате [48]. Это говорит не только о стимулирующем действии респираторных эпителиальных клеток на пневмококковые штаммы, но и о том, что эпителиальные клетки располагают большим набором рецепторов, которые используются пневмококками для закрепления на биогенных субстратах. Напомним и о других исследованиях, которые показали, что контакт с эпителиальными клетками дает более мощный рост пневмококковой биопленки по сравнению с абиогенными субстратами [17] и усиливает биопленочный рост на полистиреновых планшетах [29].

Еще одним медиатором, который является стимулом для других регуляторов биопленочного процесса, служит N-ацетилнейраминная кислота. С. Trappetti и соавт. [49] исследовали влияние различных моноуглеводов на образование биопленок музейными штаммами пневмококка и их способность к колонизации носоглотки и инвазии легких мышей. Только сialовая N-ацетилнейраминная кислота в концентрациях, близких к содержанию сialовой кислоты в слюне человека, усиливала образование биопленки. Эта кислота приводила к значительному увеличению количества пневмококка в носоглотке мышей и увеличивала его проникновение в легкие. Ингибиторы нейраминидазы (DANA, занамивир, осельтамивир) отменяли ее стимулирующий эффект. Таким образом,

нейраминидаза, секретируемая при гриппозной и других вирусных инфекциях, может высвобождать сialовую кислоту из гликоконъюгатов плазматической мембраны бактерий и клеток хозяина, способствуя усиленному образованию в носоглотке пневмококковой биопленки и отделению от нее инвазивных клонов бактерий. Этим можно объяснить эпидемиологическую корреляцию между респираторными инфекциями, вызванными вирусами, которые продуцируют нейраминидазу, и бактериальными пневмониями [49].

Пневмококки располагают тремя нейраминидазами, из которых наиболее активна NanA [50]. Ее содержат все пневмококковые штаммы [51, 52]. Экспрессия гена *nanA* повышается в условиях пневмококковой биопленки [27]. Предкультивирование бактерий на эпителиальных клетках усиливает продукцию NanA пневмококками и повышает их способность к биопленочному процессу. Подавление активности нейраминидазы (этого добивались при помощи ее ингибиторов DANA, осельтамивира и других специальных подобранных небольших молекул) отменяло симулирующий эффект NanA на образование пневмококковых биопленок. Несмотря на различия в активных центрах NanA и NanPs (нейраминидаза *Pseudomonas aeruginosa*), обе они усиливают биопленочный пневмококковый процесс, дополняя друг друга [29].

Заключение

В настоящем обзоре затронуто лишь несколько аспектов, имеющих отношение к биопленочному процессу пневмококков. Невозможно было охватить весь материал, так или иначе связанный с персистентной пневмококковой инфекцией, к которой принадлежат пневмококковые биопленки. Но необходимо очертить круг вопросов, которые представляются важными для обсуждения в дальнейшем. Остается неясным, почему разные штаммы пневмококка, имеющие близкую генетическую структуру, в одинаковых условиях дают неравнозначную биопленку и какие факторы участвуют в ее построении и регуляции. Ограничены данные о факторах, участвующих в межклеточных биопленочных реакциях разных видов бактерий. Например, недостаточно изучена тема ко-инфекции пневмококка и *Hemophilus influenzae*, когда последняя усиливает биопленочный процесс пневмококка при среднем отите [53]. По-прежнему исследуется вопрос о том, почему из более чем 90 капсульных серотипов пневмококка лишь 15–20 отвечают за инвазивные инфекции и еще меньшее их число – за глобальные вспышки пневмококковой инфекции. Сегодня мы знаем о причинах резистентности пневмококков к антибиотикам, но не умеем бороться с ней. Это относится и к проблемам биопленок. Есть метод воздействия на пневмококковые биопленки, когда их разрушение происходит под действием бактериофаговых и пневмококковых гидролаз [54]. Если этот подход будет клинически реализован, необходимо помнить о потенциальной опасности вычлечения генетически различных клонов пневмококка, которые могут оказаться инвазивными и антибиотикорезистентными. Дальнейшие исследования механизмов биопленочного процесса пневмококков и других бактерий помогут лучше понять механизмы биопленочных инфекций и разработать более эффективные методы борьбы с ними.

Сведения об авторах:

Маянский Андрей Николаевич – д-р мед. наук, проф. каф. микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВПО «НижГМА» Минздрава России;

Чеботарь Игорь Викторович – канд. мед. наук, вед. научн. сотр. лаб. микробиологии ФГБУ «НЦЗД» РАМН;

Лазарева Анна Валерьевна – канд. мед. наук, рук. лаб. микробиологии ФГБУ «НЦЗД» РАМН;

Маянский Николай Андреевич (Mayanskiy N.A.) – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторным отделом ФГБУ «НЦЗД» РАМН, e-mail: mayansky@nczd.ru.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Маянский А.Н., Молчанова И.В., Исхакова С.Х. Антитела к общим видоспецифическим антигенам пневмококка в спектре противобактериальных антител человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1982; 9: 86–90.

- Mayanskiy A.N., Molchanova I.V., Iskhakova S.H. Antitela k obshchim vidospetsificheskim antigenam pnevmokokka v spektre protivobakterial'nykh antitel cheloveka. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1982; 9: 86–90. (in Russian)
2. Corsterton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318–22.
 3. Briles D.E., Hollingshead S.K., Paton J.C. et al. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *S. pneumoniae*. *J. Infect. Dis.*. 2003; 188: 339–48.
 4. Joyce E.A., Kawale A., Censini S. et al. LuxS is required for persistent pneumococcal carriage and expression of virulence and biosynthesis genes. *Infect. Immun.* 2004; 72: 2964–75.
 5. Lizcano A., Chin T., Sauer K. et al. Early biofilm formation on microtiter plates is not correlated with the invasive disease potential of *S. pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 2010; 48: 124–30.
 6. Nistico L., Kreft R., Gieseke A. et al. Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 1411–20.
 7. Allegrucci M., Hu F.Z., Shen K. et al. Phenotypic characterization of *S. pneumoniae* biofilm development. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 2325–35.
 8. Munoz-Elias E.J., Marcano J., Camilli A. Isolation of *S. pneumoniae* biofilm mutants and their characterization during nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* 2008; 76: 5049–61.
 9. Tapiainen T., Kujala T., Kaijalainen T. et al. Biofilm formation by *S. pneumoniae* isolates from paediatric patients. *APMIS*. 2010; 118: 255–60.
 10. Camilli R., Baldassarri L. Contribution of serotype and genetic background to biofilm formation by *S. pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30: 97–102.
 11. Garcia-Castillo M., Morosini I., Valverde A. et al. Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *S. pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 59: 301–4.
 12. Moscoso M., Garcia E., Lopez R. Biofilm formation by *S. pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 7785–95.
 13. Hall-Stoodley L., Nistico L., Sambanthamoorthy K. et al. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 173–99.
 14. Domenech M., Garcia E., Prieto A., Moscoso M. Insight into the composition of the intercellular matrix of *S. pneumoniae* biofilms. *Environ. Microbiol.* 2012; 15: 502–16.
 15. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стратегия управления бактериальным биопленочным процессом. *Журнал инфектологии*. 2012; 4(3): 5–15.
 16. Allegrucci M., Sauer K. Characterization of colony morphology variants isolated from *S. pneumoniae* biofilms. *J. Bacteriol.* 2007; 189: 2030–38.
 17. Marks L.R., Parameswaran G.I., Hakansson A.P. Pneumococcal interactions with epithelial cells are crucial for optimal biofilm formation and colonization in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 2012ж 80: 2744–80.
 18. Sanchez C., Kumar N., Lizcano A. et al. *S. Pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. *PLoS One*. 2011; 6: e28738.
 19. Orihuela C.J., Gao G., Francis K.P., Tuomanen E.I. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 2004; 190: 1661–9.
 20. Sanchez C., Hurtgen B., Lizcano A. et al. Biofilm and planktonic pneumococci demonstrate disparate immunoreactivity to human convalescent sera. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 245–57.
 21. Hall-Stoodley L., Hu F.Z., Gieseke A. et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *J. A. M. A.* 2006; 296: 202–11.
 22. Sanderson A.R., Leid J., Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2006; 116: 1121–6.
 23. Hoa M., Tomovic S., Nistico L. et al. Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2009; 73: 1242–8.
 24. Al-Mutairi D., Kilty S.J. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 11: 18–23.
 25. Reid S.D., Hong W., Dew K.E. et al. *S. pneumoniae* forms surface-attached communities in the middle ear of experimentally infected chinchillas. *J. Infect. Dis.* 2009; 199: 786–94.
 26. Vidal J.E., Ludewick H.P., Kunkel R.M. et al. The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by *S. pneumoniae* strain D39. *Infect. Immun.* 2011; 79: 4050–60.
 27. Oggioni M.R., Trappetti C., Kadioglu A. et al. Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 2006; 61: 1196–210.
 28. Sanchez C., Shivshankar P., Stol K. et al. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intraspecies bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1001044.
 29. Parker D., Soong G., Planet P. et al. The NanA neuraminidase of *S. pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* 2009; 77: 3722–30.
 30. Shivshankar P., Sanchez C., Rose L.F., Orihuela C.J. The *S. pneumoniae* adhesin PsrP binds to keratin 10 on lung cells. *Mol. Microbiol.* 2009; 73: 663–79.
 31. Price K.E., Camilli A. Pneumolysin localizes to the cell wall of *S. pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191: 2163–8.
 32. Magee A.D., Yother J. Requirement for capsule in colonization by *S. pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2001; 69: 3755–61.
 33. Domenech M., Garcia E., Moscoso M. Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *S. pneumoniae*. *Environ. Microbiol.* 2009; 11: 2542–55.
 34. Weiser J.N., Markiewicz Z., Tuomanen E.I., Wani J.H. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology and nasopharyngeal colonization by *S. pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1996; 64: 2240–5.
 35. Weiser J.N. Phase variation in colony opacity by *S. pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* 1998; 4: 129–35.
 36. Orihuela C.J., Radin J.N., Sublett J.E. et al. Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect. Immun.* 2004; 72: 5582–96.
 37. Briles D.E., Novak L., Hotomi M. et al. Nasal colonization with *S. pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci. *Infect. Immun.* 2005; 73: 6945–51.
 38. Cundell D.R., Weiser J.N., Shen J. et al. Relationship between colonial morphology and adherence of *S. pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1995; 63: 757–61.
 39. Kim J.O., Weiser J.N. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *S. pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 1997; 177: 368–77.
 40. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 2000; 69: 183–215.
 41. Shepherd N.E., Harrison R.S., Fairlie D.P. Targeting quorum sensing and competence stimulation for antimicrobial chemotherapy. *Curr. Drug Targets*. 2012; 13: 1348–59.
 42. Stroehrer U.R., Paton A.W., Ogunniyi A.D., Paton J.C. Mutation of *luxS* of *S. pneumoniae* affects virulence in a mouse model. *Infect. Immun.* 2003; 71: 3206–12.
 43. Jedrzejak M.J. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001; 65: 187–207.
 44. Trappetti C., Potter A.J., Paton A.P. et al. LuxS mediates iron-dependent biofilm formation, competence, and fratricide in *S. pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2011; 79: 4550–8.
 45. Trappetti C., van der Maten E., Amin Z. et al. Site of isolation determines biofilm formation and virulence phenotypes of *S. pneumoniae* serotype 3 clinical isolates. *Infect. Immun.* 2013; 81: 505–13.
 46. Kowalko J.E., Seibert M.E. The *S. pneumoniae* competence regulatory system influences respiratory tract colonization. *Infect. Immun.* 2008; 76: 3131–40.
 47. Trappetti C., Gualdi L., Di Media L. et al. The impact of the competence quorum sensing system on *S. pneumoniae* biofilms varies depending on the experimental model. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 75–87.
 48. Vidal J.E., Howery K.E., Ludewick H.P., Nava P., Klugman K.P. Quorum-sensing systems LuxS/autoinducer 2 and Com regulate *S. pneumoniae* biofilms in a bioreactor with living cultures of human respiratory cells. *Infect. Immun.* 2013; 81: 1341–53.
 49. Trappetti C., Kadioglu A., Carter M. et al. Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. *J. Infect. Dis.* 2009; 199: 1497–505.
 50. Manco S., Hemon F., Yesikaya H. et al. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infect. Immun.* 2006; 74: 4014–20.
 51. King S.J., Whatmore A.M., Dowson C.G. NanA, a neuraminidase from *S. pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *S. oralis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187: 5376–86.
 52. Pettigrew M.M., Fennie K.P., York M.P. et al. Variation in the presence of neuraminidase genes among *S. pneumoniae* isolates with identical sequence types. *Infect. Immun.* 2006; 74: 3360–5.
 53. Weimer K.E.D., Armbruster C.E., Juneau R.A. et al. Coinfection with Haemophilus influenzae promotes pneumococcal biofilm formation during experimental otitis media and impedes the progression of pneumococcal disease. *J. Infect. Dis.* 2010; 202: 1068–75.
 54. Domenech M., Garcia E., Moscoso M. In vitro destruction of *S. pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55: 4144–8.

Поступила 07.03.14

Received 07.03.14

BIOFILM FORMATION BY STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Mayanskiy A. N., Chebotar I. V², Lazareva A. V², Mayanskiy N. A.²¹ Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia; ² Scientific Center of Children Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

The biofilm process in *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is described. Virtually all wild-type pneumococci are capable of

the biofilm formation. The pneumococcal capsule may reduce the biofilm production, and the propensity to form biofilms has a reverse correlation with the amount of the capsule material. Invasive pneumococcal isolates and noninvasive strains that persist in the nasopharynx have different biofilm potential. A number of issues related to effector and regulatory factors in the pneumococcal biofilms are discussed in this review. In the summary, a biofilm may be essential only for the persistent pneumococcal infection.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; biofilms; pneumococcal infection.

© БОДОВЕВ И.Н., ИЛЬИНА Е.Н., 2015
УДК 579.861.1:579.252.55:577.21

Бодоев И.Н., Ильина Е.Н.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ *NEISSERIA GONORRHOEA*: ИСТОРИЯ И ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ

ФГБУН НИИ физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов, 119435, Москва, Российская Федерация

Neisseria gonorrhoeae, или гонококк, является строгим патогеном человека и вызывает гонорею – инфекционное заболевание, известное более 2000 лет. Благодаря уникальной пластичности генетического материала эти бактерии приобрели способности адаптироваться к иммунной системе хозяина, вызывать повторные инфекции, а также противостоять воздействию антимикробных препаратов. Начиная с 30-х годов XX века на фоне внедрения химио- и антибиотикотерапии гонококк сформировал устойчивость почти ко всем препаратам, применяемым в лечении гонореи. Важно отметить, что известные детерминанты резистентности *N. gonorrhoeae* локализованы на плазидах и на хромосоме и приобретены вследствие горизонтального переноса генов, мутационного и рекомбинационного процессов. К сожалению, после введения каждого нового антибиотика в схему терапии гонореи, гонококку требовалось около двух десятков лет для выработки устойчивости и вытеснения чувствительной популяции бактерий. На данный момент цефтриаксон является последним антибиотиком первой линии, используемым в терапии гонореи. Однако несколько лет назад в Японии был выделен штамм гонококка, проявляющий высокий уровень устойчивости к этому препарату. Другими словами, в ближайшее время гонорея может стать неизлечима. В обзоре рассматриваются и обсуждаются хронология замещения антибиотиков, применяемых для лечения гонореи, эволюция механизмов формирования устойчивости гонококка и перспективы на будущее.

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, гонорея, генетические детерминанты, резистентность, антибиотикотерапия, антимикробные препараты.

Актуальной проблемой практического здравоохранения является гонорея – второе по распространенности на сегодняшний день заболевание, передающееся половым путем. Вызывает гонорею грамотрицательный диплококк *Neisseria gonorrhoeae*, способный колонизировать эпителии уретры, шейки матки, глотки, прямой кишки, конъюнктивы и т.д. При этом развиваются воспалительные процессы в нижних отделах мочеполового тракта, органах малого таза, а также конъюнктивиты, фарингиты, и может возникать диссеминированная гонококковая инфекция.

С начала антимикробной эры (1930-е годы) у гонококка выявлены экстраординарные способности к развитию устойчивости к антимикробным препаратам, используемым при терапии гонореи [1]. Одной из особенностей гонококка является пластичность его генома и как следствие – выраженная изменчивость. Для возбудителя гонореи характерно высокое

содержание в его геноме повторяющихся нуклеотидных последовательностей, включая IS-элементы и транспозоны. Эти особенности геномов являются причиной существования гипермутабельных и мозаичных генов, что обеспечивает значительную вариабельность структуры пилей и белков наружной мембраны (PorB1, Opa) [2, 3]. Выраженная генетическая изменчивость *N. gonorrhoeae* способствует формированию устойчивости к лекарственным препаратам за счет вовлечения разных молекулярных механизмов. К числу таких механизмов относят: инактивацию препарата, изменение мишени действия антимикробных препаратов, снижение проникновения и активное выведение (эффлюкс) препарата [1, 4].

Особого внимания заслуживают неспецифические механизмы устойчивости, например изменение проницаемости мембраны бактериальной клетки, которые могут повлиять на эффективность широкого спектра различных по воздействию противомикробных препаратов, таких как пенициллины, цефалоспорины, тетрациклин и макролиды [1, 4].

Устойчивость к антибиотикам может возникать в результате как точечных мутаций, так и горизонтального переноса генетического материала преимущественно от нейссерий других видов или штаммов. Поскольку *N. gonorrhoeae* является микробом с естественной компетентностью в течение всего жизненного цикла, то поглощение хромосомных генов лекарственной устойчивости может быть эффективным и широко распространенным процессом [5]. Постоянное воздействие антимикробных препаратов на *Neisseria* spp (во время лечения гонореи или других заболеваний) может привести к селекции устойчивых штаммов, возникших за счет спонтанных мутаций генов и/или приобретения генов (частей генов) устойчивости [6].

Приобретение устойчивости бактерий способствует их сохранению и распространению на фоне массированного и повсеместного применения антимикробных препаратов (в том числе антибиотиков). Однако возникшие детерминанты устойчивости могут в различной степени влиять на жизнеспособность бактерий в естественной среде (фитнес):

- не влиять на фитнес бактерий;
- ухудшать фитнес бактерии, что может компенсироваться наличием стабилизирующей мутации (й);
- улучшать фитнес. Последнее делает клоны более устойчивыми и успешными в распространении и вирулентности [7].

Данный обзор посвящен эволюции устойчивости гонококка к противомикробным препаратам (рис. 1), поскольку в настоящее время наблюдается быстрое и повсеместное распространение резистентных к антибиотикам штаммов *Neisseria gonorrhoeae* [8].

До появления антибиотиков лечение гонореи в основном заключалось в использовании бальзамов и уретральных про-

Для корреспонденции: Бодоев Иван Николаевич, ivan-bodoev@yandex.ru.