

СТРАТЕГИЯ УПРАВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫМ БИОПЛЕНОЧНЫМ ПРОЦЕССОМ

А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь

Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

Strategy of control for bacterial biofilm processes

A.N. Mayansky, I.V. Chebotar

Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

Резюме. Проанализированы основные направления современного поиска антибиопленочных препаратов, нацеленных на адгезивные реакции бактерий, управление QS-системами, воздействие на циклический гимерный гуанозинмонофосфат (*c-di-GMP*), секреторные бактериальные процессы. Обсуждаются подходы, которые используются для отторжения биопленки и повышения чувствительности биопленочных бактерий к антимикробным средствам. Подчеркивается, что большинство ингибиторных молекул исследовалось *in vitro* или в опытах на инфицированных мышах. Прогнозируется появление медицинских препаратов, которые позволят бороться с бактериальными биопленками, предупреждая их развитие и распространение в организме хозяина.

Ключевые слова: биопленки, бактерии, адгезия, секреция, регуляция, отторжение.

Введение

Биопленка является ключевой фазой бактериального развития, сопряженного с выживанием бактерий и формированием хронических инфекций [1–3]. Образование биопленки включает несколько стадий, таких как адгезия (обратимое и необратимое приращение к субстрату), размножение, формирование зрелой биопленки и, наконец, дисперсия, когда от биопленки отторгаются живые планктонные бактерии, чтобы повторить этот цикл, расширив биопленочный процесс. Фазы биопленки зависят от сетевых взаимоотношений регуляторных молекул, которые отвечают за биопленочный цикл [4, 5]. Такая многостадийность проявляется в фенотипическом разнообразии зрелых биопленок. Они выглядят как плоское заселение субстрата или образуют микроколонии, сообщающиеся между собой множеством микроканалов, которые, подобно кровеносной системе, служат для притока питательных веществ и удаления отработанного материала [2–5]. О том, что биопленочные бактерии имеют неодинаковые свойства, говорят опыты с материалом, взятым из разных (прежде всего поверхностных и глубинных) участков биопленки [6–8]. Это означает, что для того, чтобы повлиять

Abstract. Main directions of the modern search of the antibiofilm preparations aimed at adhesive bacterial reactions, control of QS-systems, influence over bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (*c-di-GMP*), and secretory bacterial processes are analyzed. Approaches for biofilm dispersal and increasing the sensitivity of biofilm bacteria to antimicrobial drugs are discussed. It is underlined that the majority of inhibitor molecules were studied *in vitro* or in infected mice experiments. It is prognosed that in future there will appear medical preparations which will help for fighting bacterial biofilms preventing their development and spreading in the host organism.

Key words: biofilms, bacteria, adhesion, secretion, regulation, rejection.

на биопленочный процесс, необходимо знать регуляторные и структурные факторы, которые отвечают за ту или иную стадию цикла.

Появилось множество работ, которые развивают идею об антивирулентном эффекте, нацеленном на блокаду регуляторных каналов без подавления жизненно важных функций бактерий. Полагают, что это позволит справиться с бактериальной адаптацией к лекарственным препаратам и существенно снизит численность антибиотикоустойчивых клонов бактерий [9–11]. Разработка антивирулентных препаратов особенно важна для персистентных (биопленочных) инфекций. Покрытые матриксом, биопленочные бактерии получают защиту от вредных факторов окружающей среды, в том числе от антибиотиков. Антибиотикорезистентность зависит и от того, что многие биопленочные бактерии (это прежде всего относится к глубинным слоям биопленки) имеют сниженный метаболизм и поэтому медленно размножаются [12]. Имеет значение и то, что в популяциях бактерий существуют клетки-персистеры, которые, подобно эндоспорам, вообще не размножаются, а потому имеют абсолютную устойчивость к антибиотикам [13].

В настоящем обзоре на модели, связанной главным образом с *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойной палочки), рассматриваются проблемы борьбы с биопленочным процессом на разных фазах его развития, начиная с прикрепления и кончая стадией отторжения биопленки.

Адгезия

Адгезия бактерий определяется факторами, которые играют ключевую роль в биопленочном процессе [14]. Для первичного (обратимого) прикрепления планктонные бактерии должны иметь готовые адгезины или быстро менять свой адгезивный фенотип, адаптируя его к субстрату. К первичным адгезинам относятся жгутики *Ps. aeruginosa*, пили IV типа и недавно открытые пилеподобные структуры, названные Сур-фимбриями (от англ. *chaperoneusher pathway*) [4, 15–17]. Жгутики, пили IV типа и Сур-фимбрии неспецифически прикрепляются к биогенным и абиогенным субстратам, обеспечивая начало биопленочного процесса. После адгезии бактерии лишаются активного передвижения и начинают размножаться. Формируются многоклеточные скопления (микрочлони) бактерий, характерные для зрелой биопленки. Мутанты *Ps. aeruginosa* с поврежденными жгутиками или пилиями значительно медленнее прикрепляются к поверхности глазных линз, чем их интактные варианты [18].

Пили собираются за счет белок-белок-связывающих конструкций типа шаперон-ашер (англ. *chaperone-usher*), когда один из белков (шаперон) периплазматического пространства формирует комплекс с будущим структурным белком пилей, и этот комплекс воспринимается ашерным белком клеточной мембраны [9, 19, 20]. Шапероны имеют консервативные участки, которые реагируют с разными ашерными белками, создавая возможность подавления ашер-связывающих сайтов низкомолекулярными (малыми) молекулами. Это показано на примере уропатогенных штаммов *E. coli*, которые содержат различные пили и пилеподобные отростки-кэрли (англ. *curlies* – локон, клубок), обеспечивающие прикрепление бактерий к эпителиальной поверхности мочевого пузыря и почечных лоханок. Малые молекулы, синтезированные на основе бициклических-2 пиридонов (они получили название пиллицидов и кэрлицидов), предотвращали образование пилей и амидоидных выступов-кэрлей, задерживая биопленочный процесс [19, 20]. Отметим, что пиллициды не влияют на рост бактерий, поскольку продукция пилей не связана с бактериальным размножением [20]. Это означает, что пиллициды/кэрлициды можно рассматривать как антивирулентные препараты, нацеленные на образование биопленок.

Блокаду адгезии можно получить при введении в систему гидрофобных агентов, которые тормозят

взаимодействие бактерий с субстратом. Это наблюдалось в присутствии р-нитрофенола, который почти полностью подавлял адгезию *Ps. aeruginosa* в культуре пневмоцитов человека [21]. Заблокировать прикрепление бактерий к абиогенным и биогенным субстратам удавалось при помощи полисахаридов – декстрана, декстран-сульфата, гепарина [21]. Аэрозольное применение декстрана снижает последствия *Ps. aeruginosa* пневмонии у мышей [22]. По данным [23], декстран (мол. масса 3000–70 000) тормозит прикрепление *Ps. aeruginosa* к легочным и буккальным эпителиоцитам. Эффект, скорее всего, неспецифичен, так как тот же декстран не связывался с бактериальными и эпителиальными клетками. Такое же действие оказывали и другие нейтральные полисахариды (гликоген, маннан). Они подавляли прикрепление к эпителиоцитам не только *Ps. aeruginosa*, но и других респираторных патогенов (*Staph. aureus*, *Str. pyogenes*, *Haemophilus influenzae*). Восемь из 21 олиго(моно-, ди-, три)сахаридов подавляли на 50–72% прикрепление *Ps. aeruginosa* к респираторным клеткам [21]. Это говорит, скорее всего, о том, что белок-углеводные реакции позволяют каждому бактериальному адгезину прореагировать с несколькими углеводными рецепторами клеток и в этом смысле носят неспецифический характер. Обработка респираторных клеток туникамицином (ингибитор мембранной экспрессии гликопротеинов и гликолипидов) тормозила адгезию *Ps. aeruginosa* примерно на 50% [21]. Неполную блокаду авторы объясняют тем, что взаимодействие эпителиальных клеток с бактериями зависит и от рецептор-независимых (гидрофобных и электростатических) контактов, а также от реакций типа белок-белок.

Для бактериальной адгезии имеют значение свойства субстрата, на котором происходит формирование биопленки. Поверхность должна обладать определенной гидрофобностью и положительным зарядом, чтобы воспринять неспецифическую информацию от негативно заряженных бактериальных клеток. Изменив поверхность, можно подавить прикрепление бактерий и тем самым заблокировать биопленочный процесс. Это показано для абиогенных субстратов, покрытых альфа-тропомиозином – белком из рыбных мышц [24]. Благодаря высокому негативному заряду, он отталкивает отрицательно заряженные бактериальные клетки, подавляя их прикрепление. Образование биопленки *Ps. aeruginosa* и ряда других грам-отрицательных и грам-положительных бактерий подавляется в присутствии супернатанта культуры некоторых штаммов *E. coli*, которые секретируют капсульный полисахарид группы II (один из четырех капсульных типов кишечной палочки). Реагируя с субстратом, он препятствует его взаи-

модействию с бактериями, неспецифически блокируя первичную адгезию [25]. При хронической (биопленочной) пневмонии *Ps. aeruginosa* связывается с олигосахаридными компонентами муцинов, которые секретируются на поверхность слизистых оболочек респираторного тракта. В адгезии участвуют поверхностные белки *Ps. aeruginosa*, специфически реагирующие с нейтральными и кислыми гликопептидами. Обработка нейраминидазой снижает активность муцина, что говорит о значении сиаловых кислот в адгезивных реакциях [26]. Сиаловые кислоты и N-ацетил-глюкозамин тормозили взаимодействие *Ps. aeruginosa* с муцином, что также свидетельствует об их участии в муцин-опосредованных реакциях бактерий [26].

На поверхности *Ps. aeruginosa* обнаружено два белка со свойствами лектинов — LecA и LecB [27]. Они специфически связываются с производными D-галактозы (LecA) и L-фукозы (LecB). Штаммы, лишенные LecA и LecB, хуже прикрепляются к монослою легочных эпителиальных клеток, чем бактерии, из которых они были получены [28]. Совместное введение *Ps. aeruginosa* с углеводными ингибиторами лектинов LecA и LecB (альфа-метил-галактозид и альфа-метил-фукозид) снижает повреждение респираторных клеток *in vitro* и *in vivo* (опыты на мышах) [28]. Это согласуется с недавними работами, которые показали, что LecA [27] и LecB [29] участвуют в образовании биопленочного матрикса, скрепляя между собой молекулы Psl и Pel матриксных полисахаридов (см. ниже). Неслучайно вдыхание галактозы и фукозы снижает респираторную *Ps. aeruginosa* инфекцию у человека [30]. Женское молоко (за ним следует молоко ламы, жирафа, резус-обезьяны) эффективно подавляет связывание галактофильного LecA и фукозофильного LecB лектинов *Ps. aeruginosa* с рецепторами клеток человека [31]. По мнению авторов, полимерные гликаны женского молока и других сходных с ним молочных продуктов могут быть использованы для профилактики биопленочных инфекций в клинике глазных, кожных, отоларингологических заболеваний.

Кроме LecA и LecB, на поверхности *Ps. aeruginosa* расположен еще один лектиновый белок, CdrA. Он получил свое название от того, что его продукция контролируется циклическим ди-ГМФ (англ. cyclic diguanylate-regulated — см. ниже). Ген *cdrA* относится к двухгенному оперону, один из компонентов которого отвечает за продукцию белка (CdrB), который обеспечивает секрецию своего партнера, CdrA [32]. CdrA участвует в создании стабильной биопленки, скрепляя нити матриксного Psl полисахарида. Этот процесс может быть заблокирован производными маннозы [33], т.е. CdrA обладает свойствами лектинов.

Образованию биопленки *Ps. aeruginosa* и ряда других бактерий препятствует комплекс

D-аминокислот (D-тирозин, D-лейцин, D-триптофан, D-метионин). Полагают, что этот эффект зависит от включения D-аминокислот в пептидные цепи пептидогликана (вместо конечного D-аланина), что препятствует формированию адгезивных связей с субстратом [34].

Стабильное прикрепление бактерий зависит от секреции полисахаридов, с которыми связано образование биопленочного матрикса. В колонизации муковисцедозного легкого изначально участвуют немуюкоидные формы *Ps. aeruginosa*, которые через месяцы и годы сменяются мукоидными (альгинатными) культурами [35]. Альгинатный полисахарид, в синтезе которого участвует множество факторов, издавна считался главной биопленочной субстанцией *Ps. aeruginosa*. Позже оказалось, что немуюкоидные и мутантные штаммы с дефектом альгинатных генов сохраняют способность к образованию биопленки. Это говорит о том, что *Ps. aeruginosa* располагает другими генами, которые отвечают за синтез полисахаридов, играющих важную роль в биопленочном процессе. Матриксные полисахариды поддерживают структуру биопленки тотчас после прикрепления *Ps. aeruginosa* к субстрату (Pel-полисахарида) или на более поздней стадии биопленочного процесса (Psl-полисахарида) [4]. Внеклеточные полисахариды участвуют в прикреплении *Ps. aeruginosa* к слизистым оболочкам, обеспечивая построение респираторной биопленки [36]. *Ps. aeruginosa* включает клоны, дефектные по *pel*- и *psl*-генам, и только те из них, которые имеют двойной дефект по *pel*- и *psl*-генам, не способны к образованию биопленки [37].

Адгезия и образование биопленки связаны с участием катионов металлов. Связывание (хелатирование) двухвалентных катионов при помощи ЭДТА или цитрата ведет к нарушению взаимодействия бактерий с субстратом, подавляя образование биопленки [38]. Большое внимание уделяется значению железа в инициации и поддержании структуры биопленки. Продукция сидерофоров напрямую связана с образованием биопленки *Ps. aeruginosa* [39]. На модели *E. coli* показано, что бактерии обладают специальным регуляторным протеином (Fur), который является репрессором всех систем, связанных с транспортом железа. Fur-зависимый сидерофорный Ipa-рецептор энтерогеморрагической кишечной палочки служит одним из адгезинов, которые усиливают ее прикрепление к эпителиальным почечным клеткам [40]. Соединяясь с Fe^{++} , Fur тормозит транскрипцию более 90 генов, которые участвуют в метаболизме, жгутиковой подвижности, патогенезе, окислительном и кислотном стрессе *E. coli* [41]. Показано, что Fur связывается не только с железом, но и с другими двухвалентными металлами, такими как Zn^{++} и Co^{++} . Это сопровождается

потерей способности к взаимодействию с Fe^{++} и утратой репрессорных функций Fur- Fe^{++} комплекса. Добавление микроконцентраций $ZnCl_2$ вызывает значительное снижение адгезивных и биопленочных функций *E. coli* без подавления роста бактериальных культур [42]. Можно думать, что то же самое будет происходить и с другими грам-отрицательными бактериями, в том числе с *Ps. aeruginosa*, которые зависят от железа, используя специальные рецепторы-сидерофоры и связанные с ними белки-регуляторы.

Система секреции 3-го типа (Т3SS)

Многие виды грам-отрицательных бактерий, патогенных для человека, располагают секреторной системой 3-го типа. В этом случае они вводят свои токсины непосредственно в цитозоль эукариотических клеток, используя специальный аппарат (в его сборке участвуют свыше 20 белков), который называется Т3SS-инъектосомой, или наномашинкой [43]. Для *Ps. aeruginosa* известно четыре токсина (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY), которые вводятся при помощи Т3SS [43]. Вмешиваясь в патогенез псевдомонадных инфекций, они оказывают серьезный цитотоксический эффект. Недавно считалось, что система секреции III типа имеет значение лишь для острых инфекций; при хронических (биопленочных) процессах происходит торможение Т3SS, и в конечном счете она прекращает функционирование. Сегодня эта позиция поставлена под сомнение. Н. Mikkelsen et al. [44] обнаружили, что Т3SS-гены *Ps. aeruginosa* работают и в составе биопленочных бактерий. Опубликовано несколько статей, где приводятся данные об ингибиторах Т3SS. Они прежде всего относятся к классу салицилиденацилгидразидов (salicylideneacylhydrazides), которые непосредственно действуют на Т3SS-инъектосому [9, 45, 46]. In vitro это подавляло инфекции, связанные с иерсиниями (*Y. pseudotuberculosis*), энтеротоксигенными и энтеропатогенными *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Chlamydia pneumoniae*. Возможно, в будущем на основе химического класса Т3SS-ингибиторов, салицилиденацилгидразинов, появятся новые способы борьбы с инфекционными заболеваниями, в том числе с биопленочными процессами. Следует напомнить, что среди известных бактериальных секреторных систем *Ps. aeruginosa* располагает (дополнительно к Т3SS) вариантами секреции 1, 2 и 6 типов [43]. Их блокада тоже может оказаться полезной при разработке антивирулентных (антибиопленочных) препаратов, нацеленных против *Ps. aeruginosa*.

QS-системы

К регуляторным факторам, которые обеспечивают общение между клетками, относится система

(точнее — системы) кворум-сенсинга (англ. quorum sensing, QS). Сигнальные молекулы (медиаторы, аутоиндукторы, феромоны) QS дают возможность судить о том, какое количество клеток того же или иных видов присутствует в окружении бактерий. QS определяет экспрессию нескольких сот генов, в том числе отвечающих за продукцию вирулентных факторов и элементов биопленочного матрикса. Сигнальные молекулы QS накапливаются в бактериальной популяции и аутокаталитически воздействуют на бактерии, не принимая прямого участия в бактериальном росте [47–49]. Поэтому подавление их секреции будет блокировать болезнетворность бактерий, не влияя на их жизненно важные функции, что является типичным для антивирулентной терапии.

Образование биопленки предусматривает фазу быстрого размножения, которая сопровождается колонизацией субстрата и формированием биопленочного матрикса. Именно на этой стадии следует ожидать наиболее выраженной активности QS-медиаторов и их влияния на фенотип бактерий. О том, что биопленка *Ps. aeruginosa* на разных этапах своего развития зависит от различных факторов, говорит то, что ингибиторы QS не влияют на образование ранней биопленки (когда идет процесс обратимого, т.е. временного прикрепления бактерий), но способны подавлять позднюю биопленку, вызывая ее отторжение [50]. Возможно, поэтому далеко не во всех работах отмечена зависимость биопленочного процесса от QS [4]. Некоторые авторы, отмечая значение QS-медиаторов для острой инфекции, отрицают их значение для хронической муковисцедозной пневмонии, связанной с биопленочным процессом *Ps. aeruginosa* [35]. И все-таки в большинстве работ, начиная с первого исследования [51], подчеркивается участие QS-систем в становлении и развитии бактериальных биопленок.

QS *Ps. aeruginosa* включает две главных внутривидовых подсистемы — Las и Rhl (в дальнейшем — Las- и Rhl-системы). Они продуцируют два ацилированных лактона гомосерина (AHL), которые служат их сигнальными молекулами — N-(3-оксододеcanoил)-L-гомосерин лактон (3-охо-C12-HSL) и N-бутаноилгомосерин лактон (C4-HSL). За синтез 3-охо-C12-HSL и C4-HSL отвечают AHL-синтазы, закодированные в *lasI/rhlI* генах. Достигнув определенной концентрации в окружающей среде, сигнальные молекулы связываются с рецепторными белками-регуляторами LasR/RhlR, вызывая их активацию. Активированные LasR/RhlR соединяются с другими AHL-LasR/RhlR производными, образуя димерные/мультимерные комплексы. Эти комплексы выступают как транскрипционные регуляторы, контролирующие экспрессию QS-зависимых генов-мишеней. Каждый индивиду-

альный ген имеет собственный порог LasR/RhlR-зависимой активации, который определяется численностью окружающих бактерий (англ. quorum size). Это означает, что различные гены проявляют повышенную экспрессию при разном количестве бактерий, т.е. на разных стадиях бактериального развития [8, 52]. Это относится и к биопленке. Очевидно, не существует унифицированной плотности бактерий, когда одновременно активируются все QS-зависимые гены.

Кроме Las- и Rhl-систем, *Ps. aeruginosa* имеет еще одну QS-систему, также предназначенную для внутривидового общения бактерий. Она отвечает за синтез аутоиндуктора 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона, известного как PQS (англ. pseudomonas quinolone signal), и находится под контролем LasR, который регулирует экспрессию оперонов, конвертирующих антрацилин в PQS [47–49]. Образование PQS связано с транскрипционным фактором MvfR. Это объясняет, почему галогенизированные аналоги антрацилина, реагирующие с MvfR, блокируют продукцию PQS и снижают вирулентность *Ps. aeruginosa* (опыты на мышах), не влияя на жизнеспособность бактерий [53].

Для коммуникаций с другими видами бактерий *Ps. aeruginosa* располагает по меньшей мере несколькими сигнальными медиаторами [4]. Один из них идентифицирован как короткоцепочечная цис-2-дециленовая кислота [54]. Ее добавление предотвращало развитие биопленочного процесса и полностью разрушало биопленку, образованную представителями того же (*Ps. aeruginosa*) или отдаленных таксонов (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Staph. aureus*, *Str. pyogenes*, *B. subtilis*). Показано, что другой медиатор, цис-11-метил-2-додециноивая кислота (DSF – diffusible signal factor) *Stenotrophomonas maltophilia*, усиливает биопленочный процесс *Ps. aeruginosa*. Это связано с тем, что *Ps. aeruginosa* имеет сенсорный рецептор для DSF, пересылая сигнал на хромосомные гены, от которых зависит экспрессия эффекторных белков [55].

Известно множество работ, связанных с поиском QS-ингибиторов [9, 11]. Препараты с анти-QS потенциалом должны обладать по меньшей мере одним из четырех ниже перечисленных свойств. Они могут:

- 1) ингибировать ферменты, запускающие синтез аутоиндукторов;
- 2) подавлять транскрипционные QS-регуляторы, которые связываются с аутоиндукторами, действуя на генетический материал бактерий;
- 3) блокировать аутоиндукторы QS-систем;
- 4) ингибировать вирулентные факторы, которые экспрессируются под влиянием QS-аутоиндукторов.

Следует помнить, что действие QS-ингибиторов может быть направлено не только на QS, но и на

другие генетические системы. Примером являются аналоги антрацилиновой кислоты, активность которых заметно шире, чем регулон QS-зависимых генов [53].

Взаимоотношения в бактериальных системах, а также реакции между про- и эукариотами встречаются повсеместно. Неудивительно, что те и другие располагают механизмами, которые способны атаковать «чужие» QS-системы. Это часть их борьбы за собственное выживание. Обнаружен ряд бактериальных ферментов, которые разрушают AHL-медиаторы, действуя на лактоновое кольцо (AHL-лактоназы) или на алифатические боковые цепи AHL (AHL-ацилазы) [49, 56]. К недостаткам AHL-лактоназ/ацилаз относится то, что, являясь белковыми молекулами, они вызывают образование антител, которые нейтрализуют блокирующий эффект. Отметим и то, что лактоназная реакция обратима: в нейтральной и слабощелочной среде происходит смыкание разорванного кольца и восстановление биологической активности AHL-молекулы [49].

Высшие организмы содержат ферменты, подобные бактериальным лактоназам. Они получили название параоксоназ [56, 57]. В крови и тканях человека и других млекопитающих обнаружено по меньшей мере три параоксоназы, PON1, PON2 и PON3. При выделении эпителиоцитами дыхательного тракта параоксоназы прерывают QS-сигнализацию бактерий, препятствуя накоплению респираторной биопленки у муковисцедозных больных [57]. Заметим, что параоксоназы предназначены не только для борьбы с бактериальными AHL-медиаторами. Они выполняют важные протективные функции, участвуя в борьбе против атеросклероза (гидролиз токсичных дериватов окисленного холестерина и фосфолипидов), играют роль антиоксидантов, инактивируют ряд токсичных веществ и т.д.

Макролидные антибиотики (прежде всего азитромицин) в субингибиторных концентрациях блокируют QS-системы *Ps. aeruginosa*, действуя как ингибиторы LasI- и RhlI-синтаз [58]. Не являясь классическими антипсевдомонадными агентами, макролиды оказывают лечебный эффект при хронических муковисцедозных инфекциях легких, связанных с *Ps. aeruginosa*. Одним из механизмов их действия может быть блокада образования бактериальных QS-медиаторов [12].

Ведется поиск низкомолекулярных ингибиторов транскрипционных QS-регуляторов бактерий. Обнаружено, например, что аналог AHL, в котором боковая цепь содержит бромэтилбензильную группу, подавляет LasR *Ps. aeruginosa* в микромолярных концентрациях [59]. Показано, что AHL-аналоги, в которых лактоновая группа замещена циклическими структурами (циклогексанон, фенол), устойчивы

к лактомазам, подавляя гены *lasI* и *rhII*, экспрессия которых зависит от транскрипционных регуляторов *LasR* и *RhlR* [60]. В связи с этим представляют интерес ингибиторные молекулы, не имеющие родственных связей с QS-медиаторами, а потому резистентные к действию лактомаз. Синтезирован целый ряд таких «малых» молекул. Они блокируют активность QS-регулона, что позволяет думать об их нацеленности на транскрипционные QS-регуляторы, *LasR* и *RhlR* [49]. Напомним и о промежуточных ингибиторах, которые прерывают QS-циклы, interfering с секрецией QS-аутоиндукторов. Это показано для PQS QS-системы, которая блокируется галогенизированными аналогами антраниловой кислоты (см. выше) [53].

Кроме синтетических QS-ингибиторов, исследуются естественные факторы с антиQS-активностью. Здесь прежде всего следует сказать о галогенизированных фуранонах морских водорослей *Delisea pulchra* [50]. Являясь аналогами AHL-аутоиндукторов, фураноны секретируются на поверхность листоподобного ствола водоросли, interfering с QS-зависимой подвижностью и первичной адгезией бактерий. Нативные фураноны блокируют активность QS-систем многих грамотрицательных бактерий, но почему-то не действуют на биопленочный процесс *Ps. aeruginosa*. Были испытаны многие их дериваты с различной длиной боковой цепи, заменой и усложнением фуранонового кольца. В конце концов было найдено, что высокой активностью против QS-систем *Ps. aeruginosa* обладают полусинтетические дериваты фуранонов, лишенные боковой ациловой цепи [61, 62]. Связываясь с *LasR/RhlR*-регуляторами, они подавляют экспрессию 40–60% QS-зависимых генов. Для полной QS-блокады необходимо использовать несколько QS-ингибиторов с различной аффинностью к регуляторным QS-белкам на разных стадиях клеточного цикла (см. выше).

Замечено, что многие из морских обитателей (водоросли, губки, моллюски, туникеты) не поддерживают развития бактериальных биопленок. Предполагают, что в процессе эволюции у них выработалась способность прямого или косвенного (через продукты симбиотической микрофлоры) сопротивления патогенным бактериям. Многие микробные симбионты морских организмов синтезируют вторичные метаболиты с антибиопленочной активностью [63]. Показано, например, что лизин-оксидаза морских бактерий (*Pseudoalteromonas tunicata* и *Marinomonas mediterranea*) вызывает отторжение биопленки ряда грамотрицательных бактерий. Это связано с тем, что она индуцирует продукцию перекиси водорода, которая способствует гибели бактерий [64]. Антибиопленочный скрининг природных морских продуктов привел к открытию новых ингибиторов QS-систем, таких как бромалгелиферин

и ороидин, способных подавлять образование и вызывать отторжение QS-зависимых бактериальных биопленок [11]. M.E. Skindersone et al. [65] изучили QS-ингибирующую анти-*Ps. aeruginosa* активность свыше 200 экстрактов морских обитателей. Обнаружено, что таким эффектом обладают экстракты, содержащие моноалидные дериваты. В целом, это означает, что изоляция новых бактериальных видов значительно расширит поиск продуктов, обладающих антибиопленочными свойствами.

Из других природных QS-ингибиторов, которые, возможно, также связываются с QS-регуляторами, отметим патулин, пеницилловую кислоту (продукты *Penicillium* sp.) [66] и N-гептилсульфанилацетил-1-гомосерин лактон экстракта из чеснока [67]. При добавлении патулина и пеницилловой кислоты нейтрофилы реагировали на биопленку *Ps. aeruginosa* респираторным взрывом; мыши, инъецированные патулином, быстрее, чем в контроле, освобождались от легочной инфекции [66]. Кроме чеснока, антиQS-активностью обладают экстракты из многих растений — винограда, моркови, помидоров, стручкового перца, соевых бобов, душистого горошка, водяной лилии, вьюна [66, 68].

D.G. Davies et al. [51] показали, что *lasI*-мутант *Ps. aeruginosa* менее устойчив к биоцидным веществам. Биопленки двойных *lasR/rhlR*-мутантов *Ps. aeruginosa* более чувствительны к тобрамицину и перекиси водорода, чем биопленки дикого штамма, из которого они были получены [69]. Это побудило к поиску QS-ингибиторов, которые снижают резистентность биопленок к антимикробным факторам. Биопленки *Ps. aeruginosa* и *Burkholderia cenocepacia* обнаруживают повышенную чувствительность к тобрамицину (опыты *in vitro* и *in vivo*) в комплексе с QS-ингибиторами; то же самое наблюдалось для биопленки *S. aureus* (повышение чувствительности к клиндамицину и ванкомицину) [70]. M. Hentzer et al. [61] показали, что биопленки *Ps. aeruginosa*, обработанные производными фуранона, быстро уничтожаются тобрамицином и легко диспергируются детергентами. Экстракт чеснока, патулин и пенициллиновая кислота обеспечивают более высокую чувствительность *Ps. aeruginosa* к тобрамицину [49]. При контакте с биопленкой дикого штамма *Ps. aeruginosa* нейтрофилы человека не способны уничтожить большинство биопленочных бактерий. Иначе обстоит дело с биопленками QS-мутантов или диких штаммов, обработанных QS-ингибиторами. В этом случае бактерии быстро уничтожаются нейтрофилами во время мощного респираторного взрыва [69].

Циклический димерный гуанозинмонофосфат (ц-ди-ГМФ)

В течение последних лет получены данные об участии модифицированных нуклеотидов (прежде

всего ц-ди-ГМФ) во внутриклеточной сигнализации, контролирующей биопленочный процесс. Уровень ц-ди-ГМФ определяется двумя классами ферментов – дигуанилатциклазами (они синтезируют ц-ди-ГМФ) и фосфодиэстеразами (разрушают ц-ди-ГМФ, превращая его в дигуанозинмонофосфат) [11, 71, 72]. Гены, ответственные за синтез и разрушение ц-ди-ГМФ, имеются, по-видимому, у всех прокариотов, но отсутствуют у высших эукариотов [73]. Это делает ц-ди-ГМФ привлекательной мишенью для антибиопленочных препаратов.

Гены дигуанилатциклаз и фосфодиэстераз в наибольшем количестве представлены у грамотрицательных бактерий [73]. Отсюда следует, что роль ц-ди-ГМФ в биопленочном процессе лучше всего изучена для грам-отрицательной флоры, в частности, для *Ps. aeruginosa*. Обработка биопленки *Ps. aeruginosa* токсичными соединениями тяжелых металлов ведет к ее отторжению, что, возможно, служит защитной реакцией, нацеленной на мобилизацию живых бактерий. В этом участвует сенсорный рецептор BdlA, который, реагируя на изменение окружающей среды, запускает деградацию ц-ди-ГМФ [74]. Повышенные уровни оксида азота вызывают отторжение биопленки *Ps. aeruginosa*. Это также связано с взаимодействием между оксидом азота и рецептором BdlA, вовлекающим в реакцию фосфодиэстеразу [75]. Показано, что ц-ди-ГМФ положительно влияет на экспрессию *pel*- и *psl*-генов, обеспечивающих продукцию матриксных полисахаридов *Ps. aeruginosa* [76].

Переключение синтеза ц-ди-ГМФ с высокого уровня на низкий является одним из центральных механизмов, контролирующих образование и отторжение биопленки [72, 77]. Низкие уровни необходимы для фазы прикрепления бактерий к субстрату и используются на ранних стадиях адгезии. Они сменяются высокой продукцией ц-ди-ГМФ, которая отражает фазу активного образования биопленки, обеспечивая снижение подвижности, продукции внеклеточной ДНК, повышенный синтез экзополисахаридов, агрегацию клеток и т.д. Для фазы активной дисперсии необходимо очередное ослабление уровня ц-ди-ГМФ, которое сопровождается снижением биопленочных экзополисахаридов и усилением жгутиковой подвижности [72]. Q. Ma et al. [78] обнаружили белок BdcA (от англ. biofilm dispersal via c-di-GMP), который связывает ц-ди-ГМФ и тем самым запускает отторжение биопленки *E. coli*, не влияя на ее формирование. Ген *bdcA* обладает высоким консерватизмом. Он имеет 50 – 98% гомологии для родов *Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Xanthomonas*, *Citrobacter*, *Sphingopyxis*, *Pantoea*, *Roseomonas* и 17 других родов бактерий, включая представителей рода *Pseudomonas*. Показано, что сульфатиазол (антимикробный агент) в субингибиторных концентрациях блоки-

рует синтез ц-ди-ГМФ, препятствуя развитию биопленки *E. coli* [79]. Обнаружено, что 5-фторурацил (противораковое средство) блокирует вирулентность и развитие биопленки *Ps. aeruginosa* в концентрациях, не влияющих на рост планктонных бактерий [80]. В опытах с *E. coli* 5-фторурацил действует, подавляя активность одного из глобальных регуляторов, *AgiR*, который контролирует кислотоустойчивость *E. coli* [80]. Адгезия *Ps. aeruginosa* повреждается мутациями генов, ответственных за продукцию нуклеотидов [81]. Можно ожидать, что получение новых препаратов, нацеленных на ц-ди-ГМФ и белки, причастные к его регуляции, окажется полезным для воздействия на патогенные бактерии и биопленочные процессы.

Отторжение биопленки

Высвобождение биопленочных бактерий может быть активным или пассивным [82]. Активное отторжение связано с механизмами, протекающими в самих бактериях, тогда как пассивное обычно связано с повреждением биопленочного матрикса, совершаясь под влиянием внешних факторов – ток жидкости; недостаток или внезапный избыток питательных веществ; присутствие конкурентных бактерий и фагоцитирующих клеток; добавление хелатирующих агентов, биогенных и абиогенных детергентов; ферментов, расщепляющих молекулярную основу биопленочного матрикса; факторов, нарушающих сетевые связи, которые необходимы для поддержания структуры биопленки [4]. Высвобождение бактерий повышает их чувствительность к антибиотикам и эффекторам иммунитета. Это означает, что комплексное (активное и пассивное) воздействие на биопленочный процесс может стать основой для борьбы с клинически оформленными биопленками [12, 70, 83, 84]. Выше мы уже говорили о препаратах (QS-ингибиторах, инактиваторах ц-ди-ГМФ), которые, действуя через внутренние механизмы, вызывают активное отторжение биопленки. Ниже речь пойдет о пассивном разрушении биопленки, т.е. о высвобождении биопленочных бактерий, связанном с разрушением матрикса.

Полимерный матрикс окружает биопленку, содействуя ее межклеточным контактам, связям с окружающей средой, и в конечном счете определяет способность бактерий к выживанию [2, 85]. Основными компонентами матрикса являются внеклеточные полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Поэтому все, что действует на них, будет предотвращать развитие биопленочного процесса или разрушать готовую биопленку. Одним из хорошо изученных матрикс-деградирующих ферментов является дисперсин В – гликозидгидролаза, продуцируемая периодонтопатогеном *Aggregati-*

bacter actinomycetemcomitans [82]. Дисперсин В разрушает один из главных матричных полисахаридов, поли-N-ацетилглюкозамин, препятствуя образованию биопленки и отторгая ее у поли-N-ацетилглюкозамин-образующих видов бактерий. К сожалению, *Ps. aeruginosa* принадлежит к бактериям, которые лишены поли-N-ацетилглюкозамина. Их биопленка не только выдерживает действие дисперсина В, но он даже усиливает биопленочный процесс *Ps. aeruginosa* [86].

Мукоидный (альгинатный) матрикс *Ps. aeruginosa* разрушается собственным ферментом, альгинатазой, обеспечивая сбрасывание свободных бактерий и делая их более чувствительными к антибиотикам [87]. Матриксные компоненты *Ps. aeruginosa* и *Burkholderia cenocepacia* разрушаются полисахаридными лиазами, выделенными из природных штаммов рода *Bacillus* [88]. Воздействие бактериальных гидролаз на матриксный полисахарид Psl ведет к образованию пустых пространств в центре биопленочных микроколоний и высвобождению планктонных клеток *Ps. aeruginosa* [36]. Присутствие белков предполагает чувствительность биопленочного матрикса к протеолитическим ферментам [89]. Согласно нашим неопубликованным данным, трипсин вызывает отторжение биопленки *Ps. aeruginosa*.

В субингибиторных концентрациях (0,5–5,0 мг/мл) N-ацетилцистеин (клинически признанный муколитик с антибактериальными свойствами) вызывает отторжение биопленки *Ps. aeruginosa*, снижая продукцию матриксных полисахаридов [90]. Механизм его антибиопленочного действия остается неизвестным. В дозировке 10 мг/мл N-ацетилцистеин приводил к полному подавлению биопленочного процесса, но в этой концентрации он действовал и как бактрецидный агент, убивая большинство бактерий.

G.V. Tetz et al. [83] показали, что 24-часовая биопленка *Ps. aeruginosa* (как и ряда других бактерий) чувствительна к ДНК-азе I. Это согласуется с наблюдениями о том, что ранняя биопленка (12–60 ч) *Ps. aeruginosa* разрушается ДНК-азой I, но она почти не действует на 84-часовую биопленку [91]. Между тем K. Nemoto et al. [92] показали, что 5-суточная биопленка четырех клинических штаммов *Ps. aeruginosa* охотно разрушается стрептококковой ДНК-азой. Возможно, это связано с особенностями действия ДНК-аз на ДНК-содержащие субстраты, которые могут отличаться на разных стадиях биопленочного процесса. Показано, например, что ДНК становится резистентной к ДНК-азе I после сорбции на белковых и минеральных носителях [93]. Устойчивость к ДНК-азе может вызвать ее разрушение протеолитическими ферментами, которые присутствуют в зрелой биопленке

[91]. В любом случае это говорит об особенностях биопленочного фенотипа в разные периоды его развития.

Заключение

В обзоре затронуты лишь некоторые направления, по которым развивается современный поиск антибиопленочных препаратов. Их должно быть гораздо больше, если учесть сложные (сетевые) механизмы регуляции биопленочного процесса. Намечены связи между антибиопленочными и антивирулентными препаратами, которые нацелены на мишени, от которых зависит поведение, а не гибель бактерий. Полагают, что внедрение антивирулентных препаратов удлинит сроки эволюции антибиотикорезистентных клонов бактерий и обеспечит выбор лекарств для лечения инфекционных больных. Это особенно важно для терапии хронических болезней, к которым принадлежат биопленочные процессы. Биопленки *Ps. aeruginosa* лежат в основе многих хронических инфекций, таких как цистит, простатит, отиты, раневые процессы, муковисцедозная пневмония и др. Сегодня исследуется множество средств, воздействующих на регуляторные параметры бактерий, но не затрагивающих экспрессию их жизненно важных генов. Не исключено, что для лечения биопленочных инфекций потребуются комплексное воздействие нескольких препаратов, обладающих антиадгезивными, диспергирующими, антивирулентными, бактерицидными или бактериостатическими функциями. Такая смесь должна быть безвредной, а ее отдельные компоненты не должны инактивировать друг друга. Действие большинства антибиопленочных препаратов изучалось *in vitro* или в опытах на инфицированных животных. Это объясняется их токсичностью, онкогенными свойствами, нестабильностью в водных растворах, чувствительностью к естественным ферментам, которые подавляют их активность. Хочется надеяться, что современный интерес к биопленочным инфекциям приведет к созданию лекарственных препаратов, отвечающих медицинским требованиям.

Следует напомнить о новом направлении, связанном с регуляцией сетевых взаимодействий внутри бактерий. Оно зависит от малых (англ. small) молекул РНК (sРНК), которые действуют прежде всего как антисмысловые факторы, блокируя мРНК и тем самым препятствуя их трансляции с образованием белков, некоторые из которых являются значимыми для «вирулентного поведения» бактерий [94]. Транскрипция sРНК является ответом на стрессорирующие факторы, которые улавливаются рецепторами клеток и переносятся на их генетический аппарат. Изучение sРНК может дать новый толчок для поиска антивирулентных

препаратов, которые будут влиять на «поведение» бактерий, в том числе на процесс формирования бактериальных биопленок.

Литература

1. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistence infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // *Science*. — 1999. — V. 284, № 5418. — P. 1318–1322.
2. Романова, Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол.* — 2011. — № 3. — С. 99–109.
3. Смирнова, Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова [и др.] // *Микробиология*. — 2010. — Т. 79, № 4. — С. 435–446.
4. Маянский, А.Н. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса / А.Н. Маянский [и др.] // *Мол. ген. микробиол. вирусол.* — 2012. — № 1. — С. 1–6.
5. Karatan, E. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms / E. Karatan, P. Watnick // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2009. — V. 73, № 2. — P. 310–347.
6. Lenz, A.P. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / A.P. Lenz [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2008. — V. 74, № 14. — P. 4463–4471.
7. Stewart, P.E. Physiological heterogeneity in biofilms / P.E. Stewart, M.J. Franklin // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2008. — V. 6, № 3. — P. 199–210.
8. Wagner, V.E. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment / V.E. Wagner [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2003. — V. 185, № 7. — P. 2080–2095.
9. Зигангирова, Н.А. Мишень специфический поиск антивирулентных препаратов для лечения хронических инфекций / Н.А. Зигангирова, А.Л. Гинцбург // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол.* — 2011. — № 4. — С. 107–115.
10. Barczak, A.K. Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence / A.K. Barczak, D.T. Hung // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2009. — V. 12, № 5. — P. 490–496.
11. Sintim, H.O. Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules / H.O. Sintim [et al.] // *Future Med. Chem.* — 2010. — V. 2, № 6. — P. 1005–1035.
12. Hojby N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Hojby [et al.] // *Intern. J. Antimicrob. Agents*. — 2010. — V. 35, № 4. — P. 322–332.
13. Льюс, К. Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок / К. Льюс // *Биохимия*. — 2005. — Т. 70, № 2. — С. 327–336.
14. Klemm, P. Prevention of bacterial adhesion / P. Klemm, R.M. Vejborg // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V. 88, № 2. — P. 451–459.
15. Giltner, C.L. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces / C.L. Giltner [et al.] // *Mol. Microbiol.* — 2006. — V. 59, № 4. — P. 1083–1096.
16. O'Toole, G.A. How *Pseudomonas aeruginosa* regulates surface behaviors / G.A. O'Toole // *Microbe*. — 2008. — V. 3, № 2. — P. 65–71.
17. Valet, I. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT / Valet I. [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2004. — V. 186, № 9. — P. 2880–2890.
18. Tran, V.B. Dynamics of flagellum- and pilus-mediated association of *Pseudomonas aeruginosa* with contact lens surfaces / V.B. Tran [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — V. 77, № 11. — P. 3644–3652.
19. Cegelski, L. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation / L. Cegelski [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* — 2009. — V. 5, № 12. — P. 913–919.
20. Pinkner, J.S. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria / J.S. Pinkner [et al.] // *PNAS*. — 2006. — V. 103, № 47. — P. 17897–17902.
21. Thomas, R. Common oligosaccharides moieties inhibit the adherence of typical and atypical respiratory pathogens / R. Thomas, T. Brooks // *J. Med. Microbiol.* — 2004. — V. 53, № 9. — P. 833–840.
22. Bryan, R. The effects of aerosolized dextran in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection / R. Bryan [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 1999. — V. 179, № 6. — P. 1449–1458.
23. Barghouthi, S. Inhibition by dextran of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells / S. Barghouthi, L.M. Guerdoud, D.P. Speert // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1996. — V. 154, № 6. — P. 1788–1793.
24. Vejborg, R.M. Blocking of bacterial biofilm formation by fish protein coating / R.M. Vejborg, P. Klemm // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2008. — V. 74, № 11. — P. 3551–3558.
25. Valle, J. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide / J. Valle [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2006. — V. 103, № 33. — P. 12558–12563.
26. Ramphal, R. Recognition of mucin components by *Pseudomonas aeruginosa* / R. Ramphal, S.K. Arora // *Glycoconj. J.* — 2001. — V. 18, № 9. — P. 709–713.
27. Diggle, S.P. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* / S.P. Diggle [et al.] // *Environ. Microbiol.* — 2006. — V. 8, № 6. — P. 1095–1104.
28. Chemani, C. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands / C. Chemani [et al.] // *Infect. Immun.* — 2009. — V. 77, № 5. — P. 2065–2075.
29. Tielker, D. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation / D. Tielker [et al.] // *Microbiology*. — 2005. — V. 151, № 5. — P. 1313–1323.
30. Von Bismarck, P. Successful treatment of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection with a sugar solution — a case report on a lectin based therapeutic principle / P. Von Bismarck, R. Schneppenheim, U. Schumacher // *Klin. Pediatr.* — 2001. — V. 213, № 5. — P. 285–287.
31. Zinger-Yosovich, K.D. Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum* lectins by diverse mammalian milks / K.D. Zinger-Yosovich [et al.] // *J. Dairy Sci.* — 2010. — V. 93, № 2. — P. 473–482.
32. Borlee, B.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix / B.R. Borlee [et al.] // *Mol. Microbiol.* — 2010. — V. 75, № 4. — P. 827–842.
33. Starkey, M. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung / M. Starkey [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2009. — V. 191, № 11. — P. 3492–3503.
34. Kolodkin-Gal, I. D-aminoacids trigger biofilm disassembly / I. Kolodkin-Gal [et al.] // *Science*. — 2010. — V. 328, № 5978. — P. 627–629.
35. Bjarnsholt, T. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients / T. Bjarnsholt [et al.] // *PLoS One*. — 2010. — V. 5, № 4. — P. e10115.

36. Ma, L. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix / L. Ma [et al.] // *PLoS Pathog.* — 2009. — V. 5, № 3. — P. e1000354.
37. Friedman, L. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix / L. Friedman, R. Kolter // *J. Bacteriol.* — 2004. — V. 186, № 14. — P. 4457–4465.
38. Banin, E. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm / E. Banin, K.M. Brady, E.P. Greenberg // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2006. — V. 72, № 3. — P. 2064–2069.
39. Harrison, F. Siderophore production and biofilm formation as linked social traits / F. Harrison, A. Buckling // *ISME.* — 2009. — V. 3, № 5. — P. 632–634.
40. Tarr, P.I. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure / P.I. Tarr [et al.] // *Infect. Immun.* — 2000. — V. 68, № 3. — P. 1400–1407.
41. Hantke, K. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *E. coli* K12: *fur* not only affects iron metabolism / K. Hantke // *Mol. Gen. Genet.* — 1987. — V. 210, № 1. — P. 135–139.
42. Hancock, V. Abolition of biofilm formation in urinary tract *E. coli* and *Klebsiella* isolates by metal interference through competition for *Fur* / V. Hancock, M. Dahl, P. Klemm // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — V. 76, № 12. — P. 3836–3841.
43. Filloux, A. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function / A. Filloux // *Front. Microbiol.* — 2011. — V. 2, № 1. — P. 1–21.
44. Mikkelsen, H. Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa* / H. Mikkelsen [et al.] // *Microbiology.* — 2009. — V. 155, № 3. — P. 687–698.
45. Baron, C. Antivirulence drugs to target bacterial secretion systems / C. Baron // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2010. — V. 13, № 1. — P. 100–105.
46. Keyser, P. Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against gram-negative bacteria / P. Keyser, [et al.] // *J. Intern. Med.* — 2008. — V. 264, № 1. — P. 17–29.
47. De Kievit, T.R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / T.R. De Kievit // *Environ. Microbiol.* — 2009. — V. 11, № 2. — P. 279–288.
48. Njoroge, J. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases / J. Njoroge, V. Sperandio // *EMBO Mol. Microbiol.* — 2009. — V. 1, № 4. — P. 201–210.
49. Rasmussen, T.B. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects / T.B. Rasmussen, M. Givskov // *Microbiology.* — 2006. — V. 152, № 4. — P. 895–904.
50. Hentzer, M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound / M. Hentzer [et al.] // *Microbiology.* — 2002. — V. 148, № 1. — P. 87–102.
51. Davies, D.G. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm / D.G. Davies [et al.] // *Science.* — 1998. — V. 280, № 5361. — P. 295–298.
52. Schuster, M. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis / M. Schuster [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2003. — V. 185, № 7. — P. 2066–2079.
53. Lesic, B. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds / B. Lesic [et al.] // *PLoS Pathogens.* — 2007. — V. 3, № 9. — P. e126.
54. Davies, D.G. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms / D.G. Davies, C.N. Marques // *J. Bacteriol.* — 2009. — V. 191, № 5. — P. 1393–1403.
55. Ryan, R.P. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria / R.P. Ryan, J.M. Dow // *Trends Microbiol.* — 2011. — V. 19, № 3. — P. 145–152.
56. Dong, Y.H. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes / Y.H. Dong, L.H. Zhang // *J. Microbiol.* — 2005. — V. 43. — P. 101–109.
57. Camps, J. Paraoxonases as potential antibiofilm agents: their relationship with quorum-sensing signals in gram-negative bacteria / J. Camps [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2011. — V. 55, № 4. — P. 1325–1331.
58. Nalca, Y. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach / Y. Nalca [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2006. — V. 50, № 5. — P. 1680–1688.
59. Geske, G.D. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action / G.D. Geske [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129, № 44. — P. 13613–1325.
60. Smith, K.M. Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer / K.M. Smith, Y. Bu, H. Suga // *Chem. Biol.* — 2003. — V. 10, № 6. — P. 563–571.
61. Hentzer, M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors / M. Hentzer [et al.] // *EMBO J.* — 2003. — V. 22, № 15. — P. 3803–3815.
62. Hjelmgaard, T. Synthesis of furanone-based natural product analogues with quorum sensing antagonist activity / T. Hjelmgaard [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* — 2003. — V. 11, № 15. — P. 3261–3271.
63. Nithya, C. Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / C. Nithya, M.F. Begum, S.K. Pandian // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V. 88, № 1. — P. 341–358.
64. Mai-Prochnow A. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria / A. Mai-Prochnow [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2008. — V. 190, № 15. — P. 5493–5501.
65. Skindersoe, M.E. Quorum sensing antagonism from marine organisms / M.E. Skindersoe [et al.] // *Mar. Biotechnol.* — 2008. — V. 10, № 1. — P. 56–63.
66. Rasmussen, T.B. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species / T.B. Rasmussen [et al.] // *Microbiology.* — 2005. — V. 151, № 5. — P. 1325–1340.
67. Persson, T. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic / T. Persson [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* — 2005. — V. 3, № 2. — P. 253–262.
68. Teplitski, M. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria / M. Teplitski, J.B. Robinson, W.D. Bauer // *Mol. Plant. Microbe Interact.* — 2000. — V. 13, № 6. — P. 637–648.
69. Bjarnsholt, T. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent / T. Bjarnsholt [et al.] // *Microbiology.* — 2005. — V. 151, № 2. — P. 373–383.
70. Brackman, G. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo / G. Brackman [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2011. — V. 55, № 6. — P. 2655–2661.
71. An, S. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-GMP phosphodiesterase

- with a putative hypoxia-sensing domain / S. An, J. Wu, L.H. Zhang // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — V. 76, № 24. — P. 8160–8173.
72. Landini, P. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal / P. Landini [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V. 86, № 3. — P. 813–823.
73. Galperin, M.Y. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective / M.Y. Galperin // *Environ. Microbiol.* — 2004. — V. 6, № 6. — P. 552–562.
74. Morgan, R. BdIA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* / R. Morgan [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2006. — V. 188, № 21. — P. 7335–7343.
75. Barraud, N. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal / N. Barraud [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2009. — V. 191, № 23. — P. 7333–7342.
76. Harmsen, M. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal / M. Harmsen [et al.] // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2010. — V. 59, № 3. — P. 253–268.
77. Borlee, B. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix / B. Borlee [et al.] // *Mol. Microbiol.* — 2010. — V. 75, № 4. — P. 827–842.
78. Ma, Q. Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal / Q. Ma [et al.] // *Environ. Microbiol.* — 2011. — V. 13, № 3. — P. 631–642.
79. Antoini, D. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors / D. Antoini [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V. 85, № 4. — P. 1095–1104.
80. Attila, C. 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *E. coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound / C. Attila, A. Ueda, T.K. Wood // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2009. — V. 82, № 3. — P. 525–533.
81. Ueda, A. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885) / A. Ueda, T.K. Wood // *PLoS Pathog.* — 2009. — V. 5, № 6. — P. e1000483.
82. Kaplan, J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses / J.B. Kaplan // *J. Dent. Res.* — 2010. — V. 89, № 3. — P. 205–218.
83. Tetz, G.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics / G.V. Tetz, N.K. Artemenko, V.V. Tetz // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2009. — V. 53, № 3. — P. 1204–1209.
84. Fuxman Bass, J.I. Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / J.I. Fuxman Bass [et al.] // *J. Immunol.* — 2010. — V. 184, № 11. — P. 6386–6395.
85. Flemming, H.C. The biofilm matrix / H.C. Flemming, J. Wingender // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2010. — V. 8, № 9. — P. 623–633.
86. Itoh, Y. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms / Y. Itoh [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2005. — V. 187, № 1. — P. 382–387.
87. Alkawash, M.A. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms / M.A. Alkawash, J.S. Soothill, N.L. Schiller // *APMIS.* — 2006. — V. 114, № 2. — P. 131–138.
88. Степанова, Т.В. Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образуемых *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* / Т.В. Степанова [и др.] // *Мед. алфавит. Лаборатория.* — 2010. — № 1. — С. 47–51.
89. Marti, M. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus* / M. Marti [et al.] // *Microbes Infect.* — 2010. — V. 12, № 1. — P. 55–64.
90. Zhao, T. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa* / T. Zhao, Y. Liu // *BMC Microbiol.* — 2010. — V. 10. — P. 140–148.
91. Whitchurch, C.B. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation / C.B. Whitchurch [et al.] // *Science.* — 2002. — V. 295, № 5559. — P. 1487–1490.
92. Nemoto, K. Effect of varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* / K. Nemoto [et al.] // *Chemotherapy.* — 2003. — V. 49, № 3. — P. 121–125.
93. Romanowski, G. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I / G. Romanowski, M.G. Lorenz, W. Wackernagel // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1991. — V. 57, № 4. — P. 1057–1061.
94. Storz, G. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers / G. Storz, J. Vogel, K.M. Wassarman // *Mol. Cell.* — 2011. — V. 43, № 6. — P. 880–891.

Авторский коллектив:

Маянский Андрей Николаевич — заведующий кафедрой микробиологии и иммунологии Нижегородской государственной медицинской академии Минздравсоцразвития РФ, д.м.н., профессор; тел. (831)465-50-58; (831)434-73-51; e-mail: mayansky@gma.nnov.ru;

Чеботарь Игорь Викторович — доцент кафедры микробиологии и иммунологии Нижегородской государственной медицинской академии Минздравсоцразвития РФ, к.м.н.; тел. (831)465-42-71; +7-903-607-70-54, e-mail: nizarnn@yandex.ru.