

Роль клеток-персистеров в организме человека

А.Б.Хайтович, А.А.Грищенко

Институт «Медицинская академия им. С.И.Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И.Вернадского», Симферополь, Российская Федерация

Одной из основных проблем современного здравоохранения является проблема нерационального использования антибиотикотерапии, что приводит к высокому уровню смертности от инфекционных болезней. Это обусловлено многими факторами, наиболее важным из которых является бесконтрольное использование антимикробных препаратов среди населения, что привело к возникновению лекарственно-резистентных штаммов бактерий. В связи с этим возникает необходимость в изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Изучены генетические основы выработки устойчивости бактерий и их биохимические механизмы. Как было установлено в ходе исследований, одним из таких механизмов является формирование клеток-персистеров. Это небольшая субпопуляция клеток, которая представляет собой фенотипический вариант изогенной популяции, способный сохранять жизнедеятельность в условиях действия антибиотиков или факторов окружающей среды (окислительный и кислотный стресс, гипоксия, тепловой шок, недостаток питательных веществ). Однако после появления благоприятных условий клетки-персистеры способны рекультивироваться и образовывать новую генерацию вегетативных клеток. В статье рассматриваются явление персистенции и роль клеток-персистеров в организме человека.

Ключевые слова: клетки-персистеры, молекулярно-генетические механизмы, персистенция бактерий, антибактериальные препараты, резистентность

Для цитирования: Хайтович А.Б., Грищенко А.А. Роль клеток-персистеров в организме человека. Бактериология. 2022; 7(2): 72–77. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-72-77

The role of persister cells in the human body

A.B.Khaitovich, A.A.Grishchenko

S.I.Georgievsky Medical Academy, V.I.Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

One of the main problems of modern health care is the problem of antibiotic therapy, which leads to a high mortality rate from infectious diseases. This is due to many factors, the most important of which is the uncontrolled use of antimicrobial drugs among the population, which has led to the emergence of drug-resistant strains of bacteria. In this regard, there is a need to study the molecular mechanisms underlying the formation of resistance in microorganisms. The genetic foundations of the formation of bacterial resistance and their biochemical mechanisms have been studied. As has been established by research, one of these mechanisms is the formation of persister cells. This is a small subpopulation of cells, which is a phenotypic variant of an isogenic population that is able to maintain vital activity in the presence of antibiotics or environmental factors (oxidative and acid stress, hypoxia, heat shock, lack of nutrients). However, after the onset of favorable conditions, persistent cells are able to reclaim and form a new generation of vegetative cells. The article examines aspects of the essence and role of persister cells in the human body.

Key words: persister cells, molecular genetic mechanisms, bacterial persistence, antibacterial drugs, resistance

For citation: Khaitovich A.B., Grishchenko A.A. The role of persister cells in the human body. Bacteriology. 2022; 7(2): 72–77. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-72-77

В 1942 г. Hobby G.L. обнаружил отсутствие полного лизиса культуры *Staphylococcus aureus* пенициллином, так как небольшое количество бактериальных клеток оставались жизнеспособными, дающими рост новой популяции после прекращения действия антибиотиков [1]. В 1944 г.

ирландский врач Bigger J.W., проводящий исследования в Англии, поставив опыты по влиянию пенициллина на *S. aureus*, обратил внимание на то, что под действием антибиотика бактериальная суспензия становилась прозрачной, так как происходил лизис микроорганизмов. Однако после

Для корреспонденции:

Хайтович Александр Борисович, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Института «Медицинская академия им. С.И.Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»

Адрес: 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7

Телефон: (3652) 55-4934

E-mail: khaytovych@rambler.ru

ORCID: 0000-0001-9126-1182

Статья поступила 30.03.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

For correspondence:

Alexander B. Khaitovich, MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, S.I.Georgievsky Medical Academy, V.I.Vernadsky Crimean Federal University

Address: 5/7 Lenin blvd, Simferopol, 295051, Russian Federation

Phone: (3652) 55-4934

E-mail: khaytovych@rambler.ru

ORCID: 0000-0001-9126-1182

The article was received 30.03.2022, accepted for publication 30.06.2022

переноса лизата на агаризованную среду выявлялся рост небольшого числа колоний, а при повторной инокуляции клеток на новую среду, с последующей обработкой пенициллином, вновь образовывались новые колонии. На основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что оставшиеся клетки не являются мутантами, устойчивыми к антибиотикам, а представляют собой субпопуляцию неделящихся, бездействующих клеток, которые были названы клетками-персистером [2, 3].

Около 40 последующих лет на результаты исследований не обращали внимания [4], но позднее было выявлено, что при обработке популяции другими антибиотиками часть бактерий также сохраняла жизнеспособность [5].

В 1980-е гг. Moyed H.S. возобновил исследования, связанные с персистирующими клетками [6]. Для объяснения наличия фенотипических вариаций в генетически однородных бактериальных популяциях он пытался создать мутантные штаммы, которые могут образовывать большее количество бездействующих клеток. Для этого был применен метод накопления, в основе которого лежала многократная обработка суспензии бактерий антибиотиком с дальнейшим изъятием клонов с высокими значениями минимальной подавляющей концентрации (МПК). Отбирались бактерии с неизменной МПК и большим числом клеток, невосприимчивых к колебаниям pH, антибиотическим средствам, тепловому шоку. При получении достаточного количества клеток-персистеров изучалась экспрессия генов, детерминирующих синтез внутриклеточных ингибиторов [5].

В 1990-е гг. начались исследования свойств микробных биопленок. Полученные результаты по устойчивости биопленок и одновременному отсутствию признаков антибиотикорезистентности у бактерий привлекли внимание ученых и привели к дальнейшему изучению клеток-персистеров [7–9]. В проведенных исследованиях с использованием разных доз антибиотиков на бактерии биопленок *Pseudomonas aeruginosa* в популяции были обнаружены клетки, устойчивые ко всем известным в то время антимикробным средствам [10, 11]. Аналогичные результаты были получены в отношении бактерии *Escherichia coli*. При изучении биопленок, синтезированных *E. coli*, с применением флуоресцентной микроскопии были обнаружены клетки небольшого размера, бледно окрашенные по Граму и обладающие свойствами клеток-персистеров [12, 13]. Для идентификации бездействующих клеток дополнительно использовали метод проточной цитометрии и некоторые молекулярно-генетические методы. Впоследствии было установлено, что клетки-персистеры являются покоящимися формами бактерий и обладают резистентностью к действию неблагоприятных факторов окружающей среды [14–16].

Многие исследователи оценили клетки-персистеры и антибиотикорезистентные бактерии как тождественные понятия, так как результат воздействия был схожий – основным свойством обоих явлений являлось устойчивость к летальному действию антимикробных средств. Однако после более детальных исследований к 1980-м гг. пришло понимание существенных отличий между этими явлениями [14–16].

Цель работы – изучить сущность клеток-персистеров и их влияние на развитие заболеваний в организме человека.

Задачи работы: обсуждение понятия клеток-персистеров, молекулярно-генетических механизмов их образования; выявление различий между антибиотикорезистентностью, вызванной мутациями, и естественной устойчивостью персистирующих клеток; установление роли клеток-персистеров в биопленках и выявление условий, способствующих формированию персистенции.

Материалы и методы: проведен анализ отечественной и иностранной научной литературы по проблеме персистирующих бактериальных клеток.

Невозможность получения летального эффекта антимикробными препаратами обусловлена временной невосприимчивостью небольшого количества бактерий, которое назвали бактериальной персистенцией (впервые описано у *S. aureus*) [1, 3]. Известно, что большинство бактериальных культур, находясь в стационарной фазе роста и при благоприятных условиях, содержат небольшую (1–3%) фенотипическую субпопуляцию клеток-персистеров, биологической функцией которых является сохранение популяции после длительного действия неблагоприятных факторов окружающей среды: антимикробных препаратов, дефицита питательных веществ, изменения температуры, оксидативного и кислотного стресса, гипоксии [8]. При исследовании этого феномена было установлено, что в клетках-персистером происходит ингибирование основных внутриклеточных звеньев метаболизма и репродукции: синтеза белков, клеточной стенки и репликации нуклеиновых кислот [2].

В экстремальных условиях происходит трансформация вегетативных форм в неделящиеся, персистирующие бактерии, при этом число таких клеток может варьировать вплоть до полного перехода всей популяции в состояние персистенции [17]. При наступлении благоприятных условий клетки рекультивируются в течение нескольких часов в активное состояние, при котором они чувствительны к антибиотикам, и формируют новую генерацию вегетативных клеток. Это свойство является ключевым отличием персистеров от резистентных мутировавших клеток, поскольку персистенция бактерий может быть временным и обратимым явлением [2, 18]. Присутствие в организме неактивных клеток приводит к возникновению персистирующих инфекций, при которых наблюдается повышенный риск распространения, увеличение заболеваемости и смертности [18].

В начале XXI века научный прогресс в области молекулярно-генетических механизмов бактериальной персистенции позволил культивировать одиночные клетки для исследования их жизнеспособности и физиологии. Были изобретены и предложены для оценки новые аналитические инструменты и методы изоляции отдельных клеток: компартиментализация, микрофлюидика, рамановская спектрометрия, проточная цитометрия, молекулярно-генетические методы. *Компартиментализация* – это дифференциация клеток эукариот на участки, отграниченные мембраной, в которых протекают различные метаболические процессы. *Микрофлюидика* – изучение движений микропотоков и маленьких объемов жидкостей. *Рамановская спектрометрия* – метод, основанный на взаимодействии вещества со светом, с помощью которого проводят индикацию возбудителя, что позволяет исследовать структуру бактерии. *Проточная цитометрия* – метод для быстрого оптического анализа отдель-

ных клеток. В зависимости от целей исследований эти методы сочетаются с секвенированием РНК, а также генетическим, пространственным, макромолекулярным, протеомным профилированием одиночных клеток. Посредством этих методов было обнаружено, что в регуляции персистеров участвует ряд молекулярных механизмов [19–21].

Установлено, что жизненный процесс микроорганизмов тесно сопряжен с влиянием внутреннего и наружного «молекулярного шума», который предполагает неупорядоченные колебания концентраций различных молекул и воздействует на степень экспрессии генов в отдельных клетках. Процесс «усиления шума» приводит к формированию состояния бистабильности, то есть к образованию двух или более устойчивых фенотипически различных субпопуляций клеток, которые сосуществуют в общей генетически идентичной популяции [22].

Молекулярно-генетический механизм формирования клеток-персистеров определяется тем, что бактерии посредством своих сенсорных систем воспринимают внешние раздражения, в ответ на которые вырабатывают внутриклеточные мессенджеры-индукторы (p)ppGpp (гуанозин пентафосфат и гуанозин тетрафосфат), принимающие участие в регуляции активности метаболизма бактерий [23]. Концентрация (p)ppGpp регулируется ppGpp-синтетазами, активность которых зависит от наличия аминокислот и участия гормонов RelA/SpoT (белки-гомологи, которые включают суперсемейство ферментов, синтезирующих или гидролизующих алармон ppGpp, активатор «строгого» ответа и регулятор клеточного метаболизма) [24]. Мессенджеры-индукторы влияют на формирование клеток-персистеров, изменяя активность внутриклеточных ферментов (ДНК-праймазы, РНК-полимеразы, лизиндекарбоксилазы), и, как результат, регулируют метаболическую активность и скорость репликации бактерий [24–26]. В последние десятилетия было выяснено, что ppGpp действуют на активность генетических оперонов, кодирующих токсин-антитоксиновую систему бактерий. Эта система состоит из двух генетических элементов: гена *hipA*, кодирующего стабильный токсин и обуславливающего образование белка HipA, и гена *hipB*, кодирующего лабильный антитоксин и иницирующего синтез белка HipB [27]. В благоприятных условиях антитоксин инактивирует токсин путем прямого связывания мРНК. Исследования механизма влияния белка HipA показали, что он является серин/треонин-киназой, которая посредством фосфорилирования ингибирует глутамил-Т-РНК-синтетазу, что приводит к накоплению несвязанной глутамил-Т-РНК и образованию ppGpp. Наличие высоких концентраций ppGpp стимулирует уменьшение активности экзополифосфатазы – фермента, расщепляющего полифосфаты. Благодаря этому происходит накопление полифосфатов, что приводит к стимуляции Lon-протеиназы, которая расщепляет антитоксины токсин-антитоксиновой системы. Результатом является увеличение содержания токсинов, что обуславливает ингибирование синтеза белка, клеточной стенки, внутриклеточных ферментов, в целом метаболизма и обеспечивает формирование клеток-персистеров [28].

В настоящее время обнаружено 8 механизмов влияния ТА-систем [5, 29], определяемых различными клеточными мишенями токсинов: (1) расщепление мРНК, токсином RelE,

связанных с А-сайтом рибосомы [29]; (2) разрезание не связанных с рибосомой одноцепочечных мРНК при действии MazF, MqsR и HicA [29]; (3) расщепление энтеробактериальным токсином VapC инициаторной тРНК fMet [5]; (4) расщепление нормальных тРНК микобактериальными VapC [29]; (5) разрезание сарцин-рициновой петли 23S рРНК за счет активности VapC20 и VapC23 *Mycobacterium tuberculosis* [29]; (6) фосфорилирование фактора элонгации трансляции *Mycobacterium smegmatis* и EF-Tu-токсинами Dbc-профага P1 [29]; (7) ингибирование ДНК-гиразы белками CcdB (гомологом MazF) и ParE (гомологом RelE) [29]; (8) фосфорилирование глутамил-тРНК-синтетазы токсином HipA *E. coli* [29].

Изначально токсин-антитоксиновые локусы были выявлены в составе бактериальных плазмид, которые часто подвергались горизонтальному переносу. В дальнейшем было обнаружено, что они могут располагаться в бактериальных хромосомах. Избыточная активация токсинов ведет к разрушению и гибели клеток, а соответственно, этот процесс может лежать в основе одной из перспективных стратегий, ориентированных на борьбу с персистенцией бактерий и их фенотипической резистентностью к антибиотикам [30].

Проведенные исследования выявили следующие отличия между антибиотикорезистентностью, вызванной мутациями, и естественной устойчивостью персистирующих клеток:

1) *толерантность бактерий* обусловлена фенотипической изменчивостью, которая генетически не передается, в отличие от резистентности бактерий к антибиотикам, связанной с приобретенными генетически детерминированными свойствами в результате мутаций или генетических рекомбинаций, которая передается по наследству [31];

2) одно из самых основных отличий клеток-персистеров – это *неспособность расти и размножаться при высоких концентрациях антибиотиков*, когда в фазе активного роста популяций клетки-персистеры практически отсутствуют, а возрастает их число при замедлении и прекращении роста [31];

3) *МПК персистирующих бактерий и чувствительных бактерий* практически идентична в отличие от антибиотикорезистентных [31];

4) *устойчивость персистирующих клеток к антибиотикам* является обратимым процессом [5];

5) *принцип действия антибиотиков* на физиологически активные клетки заключается в действии на определенные мишени внутри клетки, при этом происходит их подавление или активация, что приводит к внутриклеточному синтезу токсинов, аутолизина и высокореактивных кислородных радикалов и связано с механизмами действия антибиотиков на бактерии [32, 33]. В частности, стрептомицин связывается с малой субъединицей рибосомы; хлорамфеникол и эритромицин взаимодействуют с большой субъединицей рибосомы и осуществляют нарушение этапа трансляции и синтеза белка, инактивируя функции рибосом; фторхинолоны и нитромидазол блокируют репликацию и деление клетки; β-лактамы связываются и инактивируют транспептидазы, ингибируя естественную сборку молекул пептидогликанов – основы клеточной стенки бактерий; рифампицин опосредует ингибирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы; грамицидины и полимиксины вызывают нарушение целостности цитоплазматической мембраны [34]. В то же время в клетках-персистерях все мишени являются

выключенными вследствие блокировки специфическими белками, поэтому клетки-персистеры не растут и не делятся. В неактивном виде находятся бактериальная хромосома и белковые системы репликации, транскрипции и репарации, что указывает на то, что клетки проявляют мультитолерантность, то есть обладают защитой от любых видов антибиотиков в отличие от антибиотикорезистентных бактерий, которые проявляют устойчивость к одному или нескольким видам антимикробных средств [35, 36];

6) при пересеве покоящихся клеток-персистеров на новую среду они способны полностью воспроизвести популяцию, чувствительную к антибиотикам, с аналогичным небольшим количеством персистирующих клеток, что позволяет сохранить популяцию как вид при воздействии стресса разного генеза, а функцией резистентных клеток является выживание в конкретных условиях [37];

7) на практике можно обнаружить клетки-персистеры посредством смены концентрации антибиотика с контролем динамики жизнеспособных клеток, когда выявляется ниспадающая кривая линия с выделяющимися ступенями, сформированными активно растущими и персистирующими клетками, но если обработать суспензию резистентного штамма антибиотиком, то число жизнеспособных бактерий во времени изменяться не будет [8].

Очень важным в биологии бактерий является взаимоотношение способности их к персистенции и возможности образовывать биопленки. Длительное время считалось, что биопленки образуются только на медицинских изделиях, таких как катетеры, контактные линзы, эндотрахеальные трубки, внутриматочные спирали, другие медицинские изделия, но в настоящее время установлено, что способность к образованию биопленок является основным фактором патогенности, играющим существенную роль в развитии патологического процесса [38].

Биопленки являются одной из форм существования бактерий в природных популяциях и состоят из микробов, которые производят внеклеточный матрикс, включающий белки, полисахариды (декстран, гиалуроновая кислота, целлюлоза), гликолипиды и ДНК. Биопленки защищают бактерии от фагоцитоза, клеточного и гуморального иммунитета, дезинфицирующих средств химической природы. Такая защита приводит к дефициту питательных веществ, за счет чего в глубоких слоях биопленки происходит активный переход клеток в персистирующее состояние, поэтому биопленки приобретают способность защищать и от антибиотиков. Они представляют опасность для человеческого организма, поскольку могут приводить к тяжелому протеканию болезней и появлению осложнений, а также переходу патологического процесса в хроническое течение: инфекции мочевыводящих путей, муковисцидозной пневмонии, остеомиелиту, отиту, патологии околозубных тканей и самих зубов и др. Многочисленными исследованиями установлено, что хроническое течение заболеваний может быть связано с тем, что клетки-персистеры могут «прятаться» в клетках гранулем, макрофагах, желчном пузыре, слизистой желудка [38].

Как показал анализ экспериментальных исследований, формированию персистенции способствуют различные факторы, наиболее существенными из них являются:

– реализация стратегии минимизации рисков – когда в бактериальных культурах могут возникать персистирующие клетки без влияния стресса, при фенотипической гетерогенности в пределах генетически однородной культуры, а одним из механизмов выживания популяции в изменяющихся условиях среды является разная реализация генетической информации [39];

– индуцированная персистенция, которая возникает под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды (тепловой шок, окислительный и кислотный стрессы, голодание, гетерогенность условий в биопленках) [3];

– фенотипическая гетерогенность, возникающая под влиянием химических сигналов в условиях феномена «чувство кворума» – межклеточных взаимодействий бактерий в популяциях, когда возможно увеличение количества клеток-персистеров при соединении супернатанта стационарных культур и растущей культуры *P. aeruginosa* [8, 40];

– переход в нерепликативное состояние, когда при взаимодействии «патоген–хозяин», при фагоцитозе макрофагами небольшая часть бактерий захватывается. При встрече с дефицитом питательных веществ и кислой средой в вакуолях макрофагов образуются клетки-персистеры [41].

Таким образом, явление персистенции у бактерий некоторых видов имеют важное значение в биологии возбудителя, что во многом определяет их особенности в устойчивости к факторам окружающей среды и некоторым химиотерапевтическим препаратам, и развитии патологических процессов в организме человека.

Заключение

Проведенный анализ свидетельствует, что в настоящее время нельзя утверждать, что исследователи описали все механизмы персистенции бактерий, выявили все способы предотвращения их появления, возвращения бактерий к активному росту, влияния на уровень выработки токсинов внутри клеток. Изучение феномена персистенции у бактерий продолжается. Полученные новые результаты позволят лучше понимать механизмы развития патологии, а также будут использованы для создания комбинированных схем лечения, которые будут являться более эффективными и с минимальными осложнениями для организма человека.

Информация о финансировании

Работа выполнена за счет бюджетных средств института.

Financial support

The work was carried out at the expense of the budgetary funds of the Institute.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. Proc Soc Exp Biol NY. 1942;50(2):281-5. DOI: 10.3181/00379727-50-13773

2. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Aug;15(8):453-464. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.42
3. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet.* 1944;244(6320):497-500. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)74210-3
4. Van den Bergh B, Michiels JE, Fauvar M, Michiels J. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016 Jul;14(7):613-6. DOI: 10.1080/14787210.2016.1194754
5. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci.* 2008 Dec;33(5):795-805. DOI: 10.1007/s12038-008-0099-3
6. Moyed HS, Broderick SH. Molecular cloning and expression of *hipA*, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol.* 1986;166:399-403. DOI: 10.1128/jb.155.2.768-775.1983
7. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318
8. Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010;64:357-372. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
9. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:317-23. DOI: 10.1128/AAC.47.1.317-323.2003
10. Brooun A, Liu S, Lewis A. A Dose-Response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004;4:640-6. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00790
11. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol.* 2001;183:6746-51. DOI: 10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001
12. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Jan 15;230(1):13-8. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00856-5. Erratum in: *FEMS Microbiol Lett.* 2004 May 1;234(1):187.
13. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 2006 Jun 12;6:53. DOI: 10.1186/1471-2180-6-53
14. Anderl JN, Zahller E, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47:1251-1256. DOI: 10.1128/AAC.47.4.1251-1256
15. Lee SW, Foley EJ, Epstein JA. Mode of action of penicillin I. Bacterial growth and penicillin activity – *Staphylococcus aureus* FDA. *J Bacteriol.* 1944;48:393-399. DOI: 10.1128/jb.48.4.393-399.1944
16. Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J Gen Microbiol.* 1986 May;132(5):1297-304. DOI: 10.1099/00221287-132-5-1297
17. Orman MA, Brynildsen MP. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun.* 2015;6:7983. DOI: 10.1038/ncomms8983
18. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence.* 2013;4(4):273-283. DOI: 10.4161/viru.23987
19. Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: Methods and applications. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 2010;86(5):1281-92. DOI: 10.1007/s00253-010-2524-4
20. Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, Weitz DA, Griffiths AD, Heyman JA. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc.* 2013;8(5):870-891. DOI: 10.1038/nprot.2013.046
21. Peterson VM, Zhang KX, Kumar N, Wong J, Li L, Wilson DC, et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells. *Nat Biotechnol.* 2017;35(10):936-939. DOI: 10.1038/nbt.3973
22. Eldar A, Elowitz M. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature.* 2010;467:167-173. DOI: 10.1038/nature09326
23. Alawneh AM, Qi D, Yonesaki T, Otsuka Y. An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module. *Mol Microbiol.* 2016;99:188-98 DOI: 10.1111/mmi.13225
24. Sberro H, Leavitt A, Kiro R, Koh E, Peleg Y, Qimron U, et al. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Mol Cell.* 2013;50:136-48. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.02.002
25. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004;186:8172-80. DOI: 10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004
26. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jorgensen MG, Gerdes K. Bacterial Persistence by RNA Endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108:13206-13211. DOI: 10.1073/pnas.1100186108
27. Black DS, Kelly AJ, Mardis MJ, Moyed HS. Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol.* 1991;173:5732-9. DOI: 10.1128/jb.173.18.5732-5739
28. Gerdes K, Maisonneuve E. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:103-123 DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150159
29. Замахаев МВ, Гончаренко АВ, Шумков МС. Токсин-антитоксिन-системы и бактериальная персистенция (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019;55(6):523-534. DOI: 10.1134/S055510991906014X
30. Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, Gerdes K. Molecular mechanism of bacterial persistence by *HipA*. *Mol Cell.* 2013;52:248-54. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.045
31. Браунер А Различение устойчивости, толерантности и устойчивости к лечению антибиотиками. *Обзоры природы. Микробиология.* 2017;14(5):320-30. DOI: 10.1038.2016.34
32. Davis BD, Chen LL, Tai PC. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:6164-8. DOI: 10.1073/pnas.83.16.6164
33. Hooper D. Mechanism of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2001;32(1):9-15. DOI: 10.1086/319370
34. Клиническая фармакология. Под ред. Изможеровой НВ. Екатеринбург: Изд-во УГМУ; 2018, 92 с.
35. Гостев ВВ, Сидоренко СВ. Бактериальные биопленки и инфекции. *Журнал инфектологии.* 2010;2(3):4-15. DOI: 10.22625/2072-6732-2010-2-3-4-15
36. Pace JL, Rupp ME, Finch RG. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy.* Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006; 495 p. DOI: 10.1201/9781420028232
37. Тутельян АВ, Гапонов АМ, Писарев ВМ, Эль-Регистан ГИ. Дормантное состояние микроорганизмов и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Терапевтический архив.* 2015;87(11):103-8. DOI: 10.17116/terarkh20158711103-109
38. Каюмова АР, Тризна ЕЮ, Шарафутдинов ИС, Байдамшина ДР, Рыжикова МН. Биопленки как фактор патогенности *Staphylococcus aureus*: подходы к терапии. Казань: Изд-во КФУ; 2017, 99 с.
39. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature.* 1940;146:837-7. DOI: 10.1038/146837a0
40. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):237-46. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.001
41. Dandekar T, Astrid F, Jasmin P, Hensel M. *Front. Microbiol.* 2012;3(1):164. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00164

References

1. Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. *Proc Soc Exp Biol NY.* 1942;50(2):281-5. DOI: 10.3181/00379727-50-13773
2. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Aug;15(8):453-464. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.42

3. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet*. 1944;244(6320):497-500. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)74210-3
4. Van den Bergh B, Michiels JE, Fauvar M, Michiels J. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 Jul;14(7):613-6. DOI: 10.1080/14787210.2016.1194754
5. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci*. 2008 Dec;33(5):795-805. DOI: 10.1007/s12038-008-0099-3
6. Moyed HS, Broderick SH. Molecular cloning and expression of *hipA*, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol*. 1986;166:399-403. DOI: 10.1128/jb.155.2.768-775.1983
7. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318
8. Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol*. 2010;64:357-372. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
9. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:317-23. DOI: 10.1128/AAC.47.1.317-323.2003
10. Brooun A, Liu S, Lewis A. A Dose-Response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;4:640-6. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00790
11. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001;183:6746-51. DOI: 10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001
12. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Jan 15;230(1):13-8. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00856-5. Erratum in: *FEMS Microbiol Lett*. 2004 May 1;234(1):187
13. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol*. 2006 Jun 12;6:53. DOI: 10.1186/1471-2180-6-53
14. Anderl JN, Zahller E, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003;47:1251-1256. DOI: 10.1128/AAC.47.4.1251-1256
15. Lee SW, Foley EJ, Epstein JA. Mode of action of penicillin I. Bacterial growth and penicillin activity – *Staphylococcus aureus* FDA. *J Bacteriol*. 1944;48:393-399. DOI: 10.1128/jb.48.4.393-399.1944
16. Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J Gen Microbiol*. 1986 May;132(5):1297-304. DOI: 10.1099/00221287-132-5-1297
17. Orman MA, Brynildsen MP. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun*. 2015;6:7983. DOI: 10.1038/ncomms8983
18. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013;4(4):273-283. DOI: 10.4161/viru.23987
19. Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: Methods and applications. *Appl Microbiol. Biotechnol*. 2010;86(5):1281-92. DOI: 10.1007/s00253-010-2524-4
20. Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, Weitz DA, Griffiths AD, Heyman JA. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc*. 2013;8(5):870-891. DOI: 10.1038/nprot.2013.046
21. Peterson VM, Zhang KX, Kumar N, Wong J, Li L, Wilson DC, et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells. *Nat Biotechnol*. 2017;35(10):936-939. DOI: 10.1038/nbt.3973
22. Eldar A, Elowitz M. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature*. 2010;467:167-173. DOI: 10.1038/nature09326 (In Russian).
23. Alawneh AM, Qi D, Yonesaki T, Otsuka Y. An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module. *Mol Microbiol*. 2016;99:188-98 DOI: 10.1111/mmi.13225
24. Sberro H, Leavitt A, Kiro R, Koh E, Peleg Y, Qimron U, et al. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Mol Cell*. 2013;50:136-48. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.02.002
25. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004;186:8172-80. DOI: 10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004
26. Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jorgensen MG, Gerdes K. Bacterial Persistence by RNA Endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:13206-13211. DOI: 10.1073/pnas.1100186108
27. Black DS, Kelly AJ, Mardis MJ, Moyed HS. Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol*. 1991;173:5732-9. DOI: 10.1128/jb.173.18.5732-5739
28. Gerdes K, Maisonneuve E. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66:103-123 DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150159
29. Zamakhaev MV, Goncharenko AV, Shumkov MS. Toxin-antitoxin systems and bacterial persistence (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(6):571-581. DOI: 10.1134/S055510991906014X (In Russian).
30. Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, Gerdes K. Molecular mechanism of bacterial persistence by *HipA*. *Mol Cell*. 2013;52:248-54. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.045
31. Brauner A Razlichenie ustoichivosti, tolerantnosti i ustoichivosti k lecheniyu antibiotikami. *Obzory prirody. Mikrobiologiya*. 2017;14(5):320-30. DOI: 10.1038.2016.34 (In Russian).
32. Davis BD, Chen LL, Tai PC. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:6164-8. DOI: 10.1073/pnas.83.16.6164
33. Hooper D. Mechanism of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2001;32(1):9-15. DOI: 10.1086/319370
34. *Clinical pharmacology*. Edited by Izmozherova NV. Yekaterinburg, 2018, 92 p. (In Russian).
35. Gostev VV, Sidorenko SV. Bacterial biofilms and infections. *Journal Infectology*. 2010;2(3):4-15. DOI: 10.22625/2072-6732-2010-2-3-4-15 (In Russian).
36. Pace JL, Rupp ME, Finch RG. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006; 495 p. DOI: 10.1201/9781420028232
37. Tutelyan AV, Gaponov AM, Pisarev VM, Elregistan GI. Microbial dormancy and prevention of healthcare-associated infections. *Therapeutic archive*. 2015;87(11):103-8. DOI: 10.17116/terarkh20158711103-109 (In Russian).
38. Kayumova AR, Trizna IMI, Sharafutdinov IS, Baydamshina DR, Ryzhikova MN. Biofilms as a pathogenicity factor of *Staphylococcus aureus*: approaches to therapy. Kazan, 2017, 99 p. (In Russian).
39. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146:837-7. DOI: 10.1038/146837a0
40. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell*. 2006 Apr 21;125(2):237-46. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.001
41. Dandekar T, Astrid F, Jasmin P, Hensel M. *Front. Microbiol*. 2012;3(1):164. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00164

Информация об авторе:

Грищенко Алина Александровна, студентка 3-го курса 2-го медицинского факультета группы 193(1) Института «Медицинская академия им. С.И.Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»
ORCID:0000-0003-2542-4240

Information about author:

Alina A. Grishchenko, 3rd year student, 2nd Faculty of Medicine, Group 193 (1) of S.I.Georgievsky Medical Academy, V.I.Vernadsky Crimean Federal University
ORCID:0000-0003-2542-4240