Успехи биологической химии, т. 63, 2023, с. 103–148

ГИПОБИОЗ МИКОБАКТЕРИЙ: БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

©2023 г.

М. О. ШЛЕЕВА, А. С. КАПРЕЛЬЯНЦ

Институт биохимии им. А.Н.Баха,
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

I. Введение. II. Формы покоя неспорообразующих бактерий. III. Покой, персистенция и латентность: сходство и различия на примере возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*. IV. Моделирование гипометаболического состояния микобактерий в условиях постепенного закисления внешней среды. V. Биохимическая характеристика покоящихся клеток микобактерий. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В цикле развития любых бактерий наблюдается смена периода активного размножения и роста на период покоя, при котором процессы репликации отсутствуют, но сохраняется способность возвратиться к активной пролиферации. Этот цикл развития обеспечивает гомеостаз бактериальной популяции при изменении условий среды обитания [1].

Известно, что бактерии при неоптимальных условиях роста способны образовывать покоящиеся формы, которые характеризуются значительным снижением активности метаболизма, развитием устойчивости бактериальных клеток к воздействиям различных стрессов

Принятые сокращения: *Mtb – Mycobacterium tuberculosis*; *Msm – Mycobacterium smegmatis;* ЦПК – цистоподобные покоящиеся клетки; ЖНК – «жизнеспособные, но некультивируемые клетки»; ТА – «токсин–антитоксин»; ТБ – туберкулез; TACO – триптофан-аспартат содержащий белок оболочки; ЛАМ – липоарабиноманнан; TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor); γINF – гамма-интерферон; ПМ – покоящиеся микобактерии; НВЧК – наиболее вероятное число клеток; КОЕ – колониеобразующие единицы; DCPIP – 2,6-дихлорфенолиндофенол.

Адрес для корреспонденции: margoshleeva@gmail.com

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00324): разделы V–VI и в рамках государственного задания для Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН: разделы I–IV.

и отсутствием клеточного деления. Традиционно состояние покоя бактерий соотносили с формированием высокодифференцированных цист и спор. Однако для неспорообразующих бактерий также была экспериментально доказана возможность перехода в состояние покоя (гипобиоза), сопровождающееся формированием менее дифференцированных цистоподобных форм, отличающихся от спор [2]. Бактериальный гипобиоз принято рассматривать как нереплицирующееся состояние, при котором бактерии снижают метаболическую активность при практически полном отсутствии процессов транскрипции и трансляции [3]. Жизнеспособность бактерий при отсутствии способности к репликации может обеспечиваться целым рядом механизмов с разными фенотипическими проявлениями. Для некоторых бактерий существуют условия *in vitro*, которые ограничивают репликацию, но позволяют бактериям оставаться культивируемыми в стандартных условиях. Другие виды бактерий могут образовывать споры, характеризующиеся отсутствием метаболической активности и чрезвычайной устойчивостью к стрессовым воздействиям со стороны внешней среды. Важно, что среди таких бактерий обнаруживается ряд возбудителей болезней человека и животных. Особую важность представляют патогенные медленнорастущие микобактерии, такие, как *Mycobacterium leprae* или *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), которые способны выживать *in vivo* длительное время после первичного заражения за счет перехода в состояние покоя [4], что приводит к развитию латентных, трудно выявляемых форм заболеваний. Осознание этой проблемы привело к бурному экспериментальному изучению проблемы гипобиоза микобактерий в последние два десятилетия.

В настоящем обзоре представлены современные знания, касающиеся биохимических механизмов образования покоящихся микобактерий и поддержания их жизнеспособности длительное время без репликации в гипометаболическом состоянии, что важно как для фундаментальной, так и для медицинской микробиологии.

II. ФОРМЫ ПОКОЯ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Микробиологическая классификация разделяет покой бактериальных клеток на (а) пролиферативный, когда клетки перестают делиться, но сохраняют некоторую метаболическую активность, как это происходит с частью популяции в период стационарной фазы роста [1]; (б) метаболический покой, который сопряжен со значительном замедлением или отсутствием большинства метаболических процессов и

реакций. Выделяют также несколько стадий бактериального покоя: гипометаболизм (торможение метаболизма до некоторого детектируемого уровня), аметаболизм (обратимая полная остановка процессов обмена, характерен для спор бактерий). Также состояние покоя делят на эндогенное и экзогенное в зависимости от локализации индукторов и механизмов этого явления [1, 5]. Так , эндогенный покой микроорганизмов (цисты бактерий, эндо- и экзоспоры бактерий, споры грибов, конидии актиномицетов), который является стадией в жизненном цикле и естественной реакцией бактериальной клетки на неблагоприятные факторы окружающей среды, регулируется внутренними процессами организма [5]. Такие внешние факторы, как низкие температуры/замораживание (криобиоз), высушивание/обезвоживание (ангидробиоз) или выдерживание в растворах осмотически активных веществ, сахарозы или солей (осмобиоз) вызывают экзогенный покой.

Морфологически покоящиеся формы бактерий существенно различаются. Наиболее давно и хорошо изученными являются так называемые специализированные формы, которые различаются между собой по способу образования: миксоспоры миксобактерий, конидии стрептомицетов, цисты азотобактера, эндоспоры бацилл, акинеты цианобактерий, экзоспоры и цистоподобные клетки некоторых метанокисляющих и метилотрофных бактерий. В циклах вегетативного и полового развития грибов также формируются специализированные клетки – споры разных типов. Все эти образования обладают основными чертами, описанными для покоящегося состояния. Одним из важнейших свойств покоящейся клетки является длительное сохранение ее жизнеспособности с возможностью реверсии в активно делящееся состояние.

Формирование специализированных покоящихся клеток, например бактериальных спор, связано с цитодифференцировкой. Этот процесс осуществляется в результате активации генетических программ, вследствие чего образуются формы, характеризующиеся практически полным отсутствием метаболической активности и сильными структурными изменениями [6]. Такие формы отличаются повышенной устойчивостью к действию стрессовых факторов окружающей среды: неоптимальная кислотность и температура, воздействие спиртов, литических ферментов, антибиотиков, токсинов, ионизирующей радиации и т.д. Уровень устойчивости зависит как от способа и вида цитодифференцировки [7], так и от реализуемой бактериями стратегии роста [8].

Очевидно, что для этого при формировании покоящейся формы необходимы довольно сильные структурные изменения бактериальной клетки [1]. Среди покоящихся форм бактерий наиболее изученными, с точки зрения структурных перестроек, являются эндоспоры *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Clostridium*. Для эндоспор бактерий, которые образуются внутри спорангия, характерна специфическая структура: внутренняя и наружная споровые мембраны; множественные слои белков; под мембранами расположен кортекс, в состав которого входит модифицированный пептидогликан; споровый протопласт, в котором находятся все субклеточные компоненты, необходимые для прорастания споры и формирования вегетативной клетки [1].

Однако, такие специализированные покоящиеся формы известны для очень ограниченного числа микроорганизмов, в связи с этим возникает интерес к стратегиям и способам переживания стрессовых условий неспорообразующими бактериями, в частности, характерно ли для них состояние обратимого покоя [1]. В 50-х годах Биссет высказал предположение, что все бактерии должны формировать в своем цикле развития покоящиеся формы по типу микроцист [9]. Однако доказательства этой гипотезы были получены гораздо позднее. Покоящиеся клетки неспорообразующих бактерий возникают в результате действия таких же стрессовых факторов, как и характерные специализированные формы. У них также наблюдаются довольно значительные физиологические и структурные изменения, правда не такие масштабные, как в случае эндоспор. Было показано, что в результате действия факторов d_1 (аутоиндукторов анабиоза), в бактериальных культурах формируются цистоподобные покоящиеся клетки (ЦПК). Этот факт был обнаружен для дрожжей, а также для грамотрицательных и грамположительных неспорообразующих бактерий. Для ЦПК показано отсутствие экспериментально детектируемой активности метаболизма и повышение устойчивости к действию повреждающих факторов окружающей среды, а также выявлены значительные морфологические изменения по сравнению с активно размножающимися бактериями [10–12]. Факт образования ЦПК форм показан для ряда неспорообразующих микроорганизмов: *Arthrobacter globiformis*, *Escherichia coli*, *Methylococcus capsulatus*, *Pseudomonas carboxydoflava*, *Yersinia pseudotubercolosis*, *Microccocus luteus* и др. [2, 10–15].

Способность неспорообразующих микобактерий формировать покоящиеся клетки также является установленным фактом [16–18].

«НЕКУЛЬТИВИРУЕМОСТЬ» КАК ЧАСТНЫЙ СЛУЧАЙ ПОКОЯ

Многие бактерии, в число которых входят и патогенные микроорганизмы, под воздействием различных стрессов внешней среды могут переходить в особое физиологическое состояние, при котором клетки, оставаясь жизнеспособными, утрачивают способность к росту на стандартных плотных лабораторных средах [19]. Такие формы бактерий получили название «жизнеспособные, но некультивируемые клетки» (ЖНК) или как принято их называть в англоязычной литературе «viable but nonculturable» (VBNC) [20]. Несмотря на довольно низкий уровень метаболической активности, эти формы становятся способными к росту после проведения процедуры реактивации. ЖНК состояние, впервые описанное у видов *Vibrio*, а затем обнаруженное у других неспорообразующих бактерий, характеризуется отсутствием способности расти на стандартных плотных средах, хотя бактерии остаются структурно целостными, что определяется специфическим окрашиванием [21]. При этом, такие бактерии могут восстановить способность к культивированию путем добавления супернатантов, полученных из активно делящихся культур [22].

Явление «некультивируемости» бактериальных клеток широко обсуждалось в научной литературе [23–26]. Имеется значительное число публикаций, заявляющих о существовании «жизнеспособных, но некультивируемых бактерий», включающих некоторые патогенные штаммы бактерий. Клетки с «некультивируемым» фенотипом могут или поддерживать некоторую детектируемую активность или пребывать в покоящемся, неактивном состоянии. Ранее было найдено, что клетки *Micrococcus luteus,* пребывающие в длительной стационарной фазе содержат большое количество «некультивируемых» клеток, которые остаются в покоящемся состоянии в течение нескольких месяцев [20].

До сих пор непонятно, является ли состояние «некультивируемости» адаптацией к выживанию в неблагоприятных условиях или же это этап гибели бактериальной клетки. Существует несколько теорий этого состояния. Nyström предложил «теорию спонтанной клеточной смерти» [27] и определил этот процесс, как «старение бактерий, обусловленное внешними факторами». В геноме *E. coli* было выявлено ряд генов, активация которых происходит в стационарной фазе развития культуры и приводит к замедлению процесса старения бактерий. Часть этих генов участвуют в развитии устойчивости к окислительному и тепловому стрессам [28, 29]. Экспрессия этих генов контролируется сигма фактором δ^S. Во

время стационарной фазы осуществляется регуляция распределения ресурсов между такими процессами, как поддержание роста, сохранение и репарация компонентов клетки [27]. Такую регуляцию приписывают активности гена *rpoS*, продуктом которого является δ^S субъединица РНК-полимеразы, являющаяся транскрипционным регулятором многих генов, ответственных за устойчивость к стрессам. Имеется еще один сигма-фактор – δ^{70}, участвующий в поддержании жизнеспособности клеток *E. coli* в отсутствие роста. Интересно, что наблюдается антагонизм в уровне экспрессии δ^S и δ^{70} сигма-факторов, избыточная экспрессия одного из них подавляет экспрессию второго [30]. Качество окружающей среды и нуклеотид ppGpp регулируют этот антагонизм. При низких концентрациях ppGpp наблюдается экспрессия генов, находящихся под воздействием сигма-фактора δ^{70}, а повышенный уровень этого нуклеотида (в результате воздействия неблагоприятных условий) активирует фактор δ^S и помогает ему конкурировать за РНК-полимеразу [27]. В стационарной фазе роста негативное влияние на состояние бактерий оказывают различные окислительные процессы. Чаще всего, окислению подвергаются белки, синтезированные в результате ошибок в транскрипции или трансляции и имеющие доступные для окислителей группы из-за неправильного формирования вторичной и третичной структур, которые при нормальном синтезе белка скрыты [27, 31–33]. Подобные окислительные повреждения не приводят к увеличению синтеза белков окислительного стресса. Таким образом, увеличение числа окисленных белков не всегда является следствием повышения концентрации активных форм кислорода и неэффективности систем его дезактивации [31]. Увеличение доли окислительных повреждений белков приводит к активации фактора δ^S, благодаря которому их процент понижается [34]. Однако, в глубокой стационарной фазе окислительные процессы достигают такого масштаба, что, как предполагается, это и приводит к развитию обратимой «некультивируемости» бактерий, а затем и к смерти бактериальных клеток.

Вторая теория, объясняющая развитие «некультивируемого» состояния у бактерий основана на идее «программируемой клеточной смерти». Было продемонстрировано, что в бактериальных клетках имеются локусы, состоящие из парных генов, белковыми продуктами которых являются так называемые «токсин» и «антитоксин». Благодаря белок-белковым взаимодействиям молекулы «антитоксина» могут нейтрализовать соответствующий «токсин» (во многих случаях являющиеся РНКазами). Такие генные участки могут быть множественными и находится как в плазмидах, так и в хромосоме. Так, в

хромосоме *E. coli* имеется пять подобных локусов [33]. Обычно белок «токсина» более стабилен, чем «антитоксина», и в случае отсутствия соответствующего баланса, бактериальная клетка погибает [35, 36]. Высказано предположение, что благодаря этим локусам запускаются процессы, вызывающие программируемую клеточную смерть. Продемонстрировано, что гиперпродукция белка MazF, являющегося «токсином» в паре MazEF, где MazE – «антитоксин», приводит к значительному снижению числа колониеобразующих клеток в популяции *E. coli* по сравнению с контрольным штаммом при росте в оптимальных условиях [37]. А при повышении концентрации ppGpp наблюдается снижение уровня транскрипции оперона mazEF, в результате более стабильный «токсин» не блокируется «антитоксином» и наблюдается гибель клеток [27, 33, 37]. Было предположено, что подобный механизм регуляции смерти большей части популяции, дает шанс оставшимся микроорганизмам выжить в стрессовых условиях и необходим для выживания вида в целом [37]. Однако, поскольку транскрипция генов оперона mazEF активируется в логарифмической фазе роста культур в условиях стресса, было предположено , что «токсин-антитоксин» (ТА) пары могут не убивать бактериальные клетки, а участвовать в регуляции основных процессов, таких как трансляция или репликация, в условиях блокирования ростовых функций [27, 33]. Действительно, было показано, что сверхпродукция токсинов RelA и MazF является не бактерицидной, а скорее бактериостатической в отношении клеток *E. coli* и переводит их в состояние, при котором они еще жизнеспособны, но не способны к росту на плотных средах. Это явление полностью исчезает в случае увеличения уровня экспрессии соответствующих «антитоксинов». Таким образом, ТА – системы являются глобальными регуляторами активности клеточных процессов и репликации клеток [38].

И, наконец, существует еще одна теория, связывающая образование ЖНК форм бактерий с формированием покоящегося состояния. Согласно этой теории переход бактерий в «некультивируемое» состояние является стратегией переживания, которую реализует бактериальная клетка в ответ на давление неблагоприятных условий окружающей среды, таких как осмотический или окислительный шок, недостаток питательных веществ, неоптимальные температурные воздействия [39]. Подобное состояние было описано для *Micrococcus luteus*, пребывающей в длительной стационарной фазе [40] и сопоставимо со спорообразованием [41, 42].

Развитие «некультивируемого» состояния может быть вызвано факторами, которые используются в качестве бактерицидной обра-

ботки, например пастеризация молока [43] или хлорирование воды [44]. Жизнеспособность таких форм устанавливается с помощью применения различных методов выявления целостности мембран и метаболической активности, а также переводом в активное состояние [22, 40].

Явление «некультивируемости» довольно широко распространено в мире бактерий. Показано, что многие патогенные бактерии, испытывая стрессовые воздействия внешней среды, образуют «некультивируемые» формы. Это явление может быть вызвано недостатком питательных веществ в воде, пониженными значениями температуры, влиянием других микроорганизмов [45–48] и хлорированием водопроводной воды [49]. Продемонстрировано, что способность переходить в «некультивируемое» состояние является штаммоспецифичной характеристикой. Так, не все штаммы *Campylobacter jejuni* могут образовывать «некультивируемые» формы [50]. Наряду с водной средой, ЖНК формы бактерий могут возникать и в аэрозоле, как показано для *Serratia marcescens* [51]. Индукция образования «некультивируемого» состояния у патогенных бактерий может происходить в результате использования антибиотиков, что установлено для *Helicobacter pylori* [52, 53]. Пробиотические бактерии, например *Lactococcus lactis*, также способны переходить в ЖНК состояние, при этом сохраняя некоторый уровень метаболической активности [54]. Было показано, что недостаток углеводов может индуцировать этот переход. В зависимости от особенностей углеводного обмена наблюдается разнообразие между штаммами по времени образования ЖНК форм и оно варьирует от одной недели до 3-х месяцев [54].

Переход бактерий в «некультивируемое» состояние обычно сопровождается уменьшением размеров клеток и значительными изменениями в их метаболизме, которые проявляются в понижении уровней дыхания, синтеза макромолекул, а также снижается активность трансмембранного транспорта [55]. При этом метаболизм полностью не останавливается, а синтезируются различные «стрессорные» белки, обеспечивающие выживание бактерий в неоптимальных условиях [22]. Для некоторых штаммов *Vibrio vulnificus* было показано *in vitro* и *in situ*, что в ЖНК состоянии сохраняется экспрессия ряда генов, в частности, *rpoS* и *katG*, что коррелирует с чувствительностью «некультивируемых» бактерий к активным формам кислорода [56]. Было обнаружено, что спустя 4.5 месяцев хранения в «некультивируемых» формах *Vibrio vulnificus* наблюдается экспрессия некоторых генов, хотя их отношение к ЖНК состоянию не установлено [57]. Для культуры *Shigella dysenteriae*

1–2 месячного возраста установлено наличие активного транспорта метионина и его включение в состав белков [58]. В период «некультивируемости» происходят заметные изменения в клеточной стенке бактерий. Изменяется состав жирных кислот в цитоплазматической мембране, что отражается на значении мембранного потенциала [22]. В клеточной стенке ЖНК форм в отличие от активно растущих бактерий наблюдается увеличение числа межпептидных связей, 3-х кратное увеличение ДАП-ДАП связей и укорочение гликановых цепей, а также возрастает доля липопротеидов, ковалентно связанных с муропептидами [59]. Для многих патогенных микроорганизмов (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, энтеропатогенные штаммы *E. coli* и др.) сохраняется активность факторов вирулентности в состоянии «некультивируемости». ЖНК формы таких бактерий оказались способны синтезировать токсины, а у некоторых видов сохраняется способность к адгезии [58, 60, 61]. Так клетки *Streptococcus parauberis* сохраняли вирулентные свойства через 4 месяца после образования ЖНК форм [39]. Пребывая в «некультивируемом» состоянии клетки *Vibrio cholerae* способны продуцировать токсин и при попадании в организм хозяина довольно быстро переходят в активное состояние [62].

Для микобактерий также продемонстрированы случаи образования «некультивируемых» форм. Так, было обнаружено, что при исследовании резекционных образцов пораженных туберкулезом органов пациентов (легкие, селезенка) в большей половине проб содержались микобактерии, которые детектировались микроскопически, но не образовывали колоний при высеве на плотные среды [63]. Эти наблюдения были подтверждены и в другой работе [64].

Хоменко с соавт. обнаружили мелкие (фильтрующиеся) формы *M. tuberculosis* в тканях больных, которые, по-видимому, обеспечивают персистенцию возбудителя туберкулеза. Эти формы были некультивируемы на стандартных лабораторных средах. Однако введение в организм животного фильтрующихся форм вызывало во многих случаях развитие туберкулезного процесса с последующим высевом возбудителя туберкулеза [65].

Бикетовым и другими было продемонстрировано, что клетки *M. tuberculosis*, изолированные из культивируемых макрофагов, были неспособны к формированию колоний на агаризованной среде, но могли расти в жидкой среде после инкубации с реактивирующим белком Rpf [66]. Дилон с соавт. обнаружил, что в тканях животных с хронической формой туберкулеза лишь 1–5% изолированных микобактерий образовывали колонии на плотных средах, в то же время

реактивация этих клеток в жидкой среде приводила к увеличению численности культивируемых форм в 20–100 раз [67].

Маккун и Томпсет показали, что введение комбинации химиопрепаратов изониазида и пиразинамида при инфицировании мышей возбудителем туберкулеза приводит к кажущемуся отсутствию микобактерий при высеве на плотные среды проб из легких и селезенки [68]. Однако, после окончания курса лечения антибиотиками, в тканях мышей были обнаружены культивируемые туберкулезные палочки, что трактовалось исследователями как реверсия покоящихся «некультивируемых» форм к росту [69]. С использованием больших объемов инфицирующего материала и меньших доз антибиотиков, в схожей модели было показано снижение в 10^7 раз способности к колониеобразованию на плотных средах микобактерий из тканей зараженных мышей [70]. При этом отмечено всего лишь 30-кратное снижение численности клеток возбудителя туберкулеза, определяемого по титру геномных копий (ПЦР).

Таким образом, результаты цитируемых работ свидетельствуют о значимости образования «некультивируемых» микобактерий, что может быть важным фактором в развитии латентного туберкулеза.

В целом, переход бактерий в состояние покоя и «некультивируемости» играет важную роль в выживании микроорганизмов в неблагоприятных условиях. Благодаря этому адаптивному механизму бактерии могут свести к минимуму повреждения клеточных структур в стрессовых условиях и сохранять потенциал к реактивации в длительный период времени.

Способность патогенных и условно патогенных бактерий образовывать ЖНК формы затрудняет диагностику заболеваний, которые они вызывают, а также их обнаружение в природных резервуарах. Поскольку у таких адаптированных к стрессу бактериях сохраняется вирулентность, это может привести к возникновению заболевания, вызванного ЖНК клетками. Однако только в относительно немногих случаях показан переход таких бактерий к нормальному, жизнеспособному (культивируемому) состоянию. Подавляющее большинство опубликованных экспериментов четко не демонстрируют реактивацию некультивируемых бактерий [24]. Пока для таких ЖНК бактерий не будет доказана способность к реактивации их микробиологическое и медицинское значение остается под вопросом.

III. ПОКОЙ, ПЕРСИСТЕНЦИЯ И ЛАТЕНТНОСТЬ: СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЯ НА ПРИМЕРЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Среди видов бактерий, которые вызывают эпидемические заболевания человека, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), являющийся возбудителем туберкулеза (ТБ), особенно успешен. *Mtb* обладает уникальной способностью вызывать скрытую инфекцию, в результате чего развивается латентная форма туберкулеза. Известно, что одна четверть населения мира латентно инфицирована *Mtb*, в результате чего создается огромный потенциал в плане реактивации заболевания и его последующего распространения (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis). Процесс развития латентной формы этого заболевания зависит от индивидуальных особенностей иммунной системы носителя и от пока недостаточно изученных взаимодействий патоген-хозяин. Нет никаких гарантий, что инфекция будет оставаться в латентной форме на протяжении всей жизни носителя, так как различные факторы (прием лекарств, старение, сопутствующие заболевания и др.) могут ослабить давление иммунной системы и привести к развитию активной формы заболевания. В группе особого риска находятся, прежде всего, пациенты с низким иммунным статусом, зараженные ВИЧ или подвергающиеся иммуносупрессионной терапии. У ВИЧ-положительных больных риск активации латентного ТБ многократно увеличивается, достигая 8–10 % в год, что составляет миллионы случаев в год в масштабах планеты (ВОЗ, 2017). Очевидно, что проблема латентного ТБ и его реактивации имеет первостепенную важность для современной медицины. В 10–15 % случаев покоящиеся микобактерии переходят к активному делению, что приводит к активации заболевания [71]. В состоянии покоя клетки *Mtb* приобретают устойчивость ко многим известным антибактериальным препаратам и способны десятилетиями сохранять жизнеспособность в организме человека, а затем под воздействием ряда факторов переходить в состояние активного размножения, вызывая рецидив заболевания [72].

Предполагается, что латентная форма связана с нахождением возбудителя в покоящемся состоянии. Хотя термины «покой», «персистенция» и «латентность» часто используются в литературе как взаимозаменяемые, они отражают различные явления, которые могут быть фенотипически похожи.

Латентность, как определение, используется для характеристики заболевания, в частности туберкулеза, в случаях, когда наличие

возбудителя диагностируют специфическими тестами (такими, как туберкулиновая кожная проба, диаскин тест или квантифероновый тест) при отсутствии клинических или радиографических проявлений болезни [73]. Эту форму заболевания очень трудно изучать, так как бактерии недоступны и проблематичны для визуализации в организме пациентов. В общих чертах, туберкулезные бациллы не высеваются из мокроты и других биологических образцов латентно инфицированных людей [74]. Такое поведение бактерий связывают с их переходом в состояние покоя под воздействием совокупности стрессовых факторов (ответ со стороны иммунной системы, антибиотикотерапия, недостатком кислорода и некоторых питательных субстратов).

Покоящееся состояние *Mtb* , согласно определению, данному во Введении, – *обратимое* состояние возбудителя, при котором происходит значительное снижение уровня метаболической активности, а бактериальная клетка способна сохранять жизнеспособность длительное время в таком состоянии без размножения [20]. Покой *Mtb* может приводить к двум явлениям при течении ТБ у человека: во-первых, субпопуляция покоящихся бактерий может быть ответственна за развитие латентного ТБ и, во-вторых, устойчивость к медикаментам и высокие показатели рецидивов, наблюдаемые при лечении антибиотиками, направленными против активного ТБ.

Некоторые данные свидетельствуют о том, что *Mtb* сохраняется у людей в течение продолжительных периодов времени. Исторически, до появления химиотерапии, туберкулез у многих людей протекал в виде множественных эпизодов латентного периода и спонтанной реактивации. Лизаты из гранулем, выделенных у латентно инфицированных пациентов, могут инфицировать морских свинок, и они, по-видимому, содержат микобактерии [75]. Молекулярное доказательство для длительной персистенции *Mtb* собрали датские исследователи путем анализа фрагментного полиморфизма штаммов возбудителя ТБ. Оказалось, что штаммы *Mtb*, собранные у пациентов в 1990-х годах были идентичны или очень похожи на каталогизированные штаммы, собранные в 1960-х годах [76]. Эти штаммы были обнаружены у пожилых людей, которые были, вероятно, впервые заражены *Mtb* десятилетия назад и не проявляли видимых симптомов заболевания вплоть до реактивации латентного ТБ в 1990-х годах. На самом деле, типирование штамма показало, что пациент был латентно инфицирован около 33 лет после первичного заражения [71]. Лечение латентного туберкулеза требует расширенного курса антибиотиков. Даже использование комбинированной терапии требует нескольких

лет лечения; более короткие курсы приводят к высокой частоте рецидивов. Исследования на животных позволяют предположить, что этот слабый ответ на антибиотики может быть частично обусловлен очень устойчивой к лекарствам субпопуляцией бактерий. Иногда известные как персистеры [77], эти бактерии могут частично состоять из покоящихся клеток, которые также ответственны за латентность.

Локализация покоящихся клеток возбудителя в тканях хозяина до сих пор остается предметом дискуссий. Общепринято, что заражение человека происходит воздушно-капельным путем вдыхания аэрозолей, содержащих клетки *M. tuberculosis*, выделяемые инфицированными людьми. Бактерии поглощаются в основном альвеолярными макрофагами, которые служат основной нишей для роста бактерий [78]. У большинства людей эта первичная инфекция в конечном итоге контролируется активацией адаптивного иммунитета. При заболевании, на начальных стадиях заражения наблюдается воспалительный процесс и гибель нейтрофилов и макрофагов, а также разрушение легочной ткани токсичными иммунными продуктами, что приводит к возникновению казеозного некроза, на котором живет и делится внеклеточный *Mtb* [79, 80]. Из-за плохой перфузии это образование (гранулема) считается гипоксической. Действительно, модели на множестве животных с патологией, сходной с туберкулезом человека, показали образование гранулем, в которых развивается гипоксия [81]. Эта структура, гранулема, является отличительной чертой туберкулеза и имеет решающее значение для ограничения распространения инфекции [82]. Для многих людей прогрессирование заболевания на этой стадии останавливается, что приводит к длительному латентному периоду. Таким образом, гипоксическая гранулема может быть местом локализации покоящихся форм *Mtb* в организме. Однако, выявление культивируемых клеток *Mtb* у латентно инфицированных людей чрезвычайно сложно, что указывает либо на низкую концентрацию бактерий в период латентности, либо на изменение их физиологического состояния.

Понятие **персистенция** означает переживание бактерий без деления как следствие действия стрессовых факторов. Такое состояние микроорганизмов, позволяющее сохранять жизнеспособность популяции в условиях стресса, характеризуется их устойчивостью к стрессовым физико-химическим факторам внешней среды, формированием стабильных антагонистических эффектов в биоценозе и приобретением устойчивости к защитным механизмам иммунной системы хозяина [83]. Понятие «персистеры» было впервые применено для характеристики небольшого количества клеток *Staphylo-*

coccus, которые способны выживать в процессе длительного лечения пенициллином [84]. В дальнейшем, это определение было использовано для возбудителя ТБ и основывается на способности генетически чувствительных к антибиотикам бактерий выживать в организме хозяина после лечения лекарственными препаратами [85]. Для персистирующих бактерий не характерна генотипическая резистентность, и, после активации из состояния персистенции, даже обычная ингибирующая концентрация антибиотиков приводит к гибели таких бактерий [86].

Возникновение персистентных форм под действием антибиотиков продемонстрировано наравне с микобактериями для ряда патогенных микроорганизмов – *Streptococcus pneumoniae* [87], *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [88], *Treponema pallidum* [89], *Streptococcus pyogenes* [90]. Было обнаружено, что скорость гибели бактерий под действием антибиотиков пропорциональна метаболической активности микроорганизмов и скорости их деления [91].

В ряде экспериментов обнаружено, что возбудитель латентного ТБ характеризуется «некультивируемым» фенотипом, о котором говорилось выше. Так при геномном секвенировании клеток *Mtb*, выделенных из образцов обезьян с латентной формой ТБ, были обнаружены множественные мутации в геноме бактерий, что связали с влиянием окислительного стресса, при этом эти формы не высевались на стандартных лабораторных средах [92]. Подобные результаты были получены в ряде работ [71, 76, 93].

Можно сказать, что персистенция микобактерий возникает как результат взаимодействия с антибиотиками, а появление покоящихся форм возбудителя латентного ТБ отражает активность иммунной системы организма хозяина. Эти феномены в какой-то степени отражают аналогичные физиологические состояния микобактерий и, по всей вероятности, фенотипически связаны. В отличие от покоящихся форм, персистирующие бактерии более чувствительны к пиразинамиду и рифампицину (ингибирование синтезов РНК), но не к изониазиду (ингибирование синтеза клеточной стенки) [94, 95]. Но в том, и другом случае развивается устойчивость к ряду противотуберкулезных препаратов, что является их главной общей характеристикой. В тоже время, основным различием этих двух физиологических состояний является транзиентный характер персистентного состояния в отличие от длительного покоящегося состояния, характеризующееся значительными морфологическими и биохимическими изменениями.

IV. МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ ПОСТЕПЕННОГО ЗАКИСЛЕНИЯ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Покоящиеся микобактерии (ПМ) невозможно извлечь из тканей и органов инфицированных людей поскольку их количество крайне мало, что обусловливает трудности в изучении механизмов перехода микобактерий в состояние покоя и для разработки новых подходов к борьбе с латентной формой инфекции. Как упоминалось выше, характерным свойством микобактерий при латентном носительстве является неспособность к росту при посевах на стандартных лабораторных средах, что затрудняет их выделение. Практически единственным подходом для изучения покоящихся форм *Mtb* является создание адекватных моделей *in vitro*, наиболее близко отражающих ситуацию носительства *in vivo*. Для моделирования состояния покоя были определены основные свойства, характерные для состояния возбудителя ТБ во время латентной фазы заболевания [71, 72]: 1) отсутствие размножения; 2) отсутствие или крайне низкая метаболическая активность; 3) устойчивость к антибиотикам (в том числе к рифампицину); 4) «некультивируемость» при высеве на стандартных плотных средах; 5) способность к длительному выживанию в условиях отсутствия размножения; 6) выраженные изменения морфологии клетки; 7) способность к реактивации и росту. В литературе можно найти несколько экспериментальных моделей [96–100], которые как полагают, отражают состояние латентности, в том числе наиболее известная модель Вейна [101], основанная на пребывании бактерий при гипоксии. Однако ни одна из этих моделей не удовлетворяет полностью критериям, приведенным выше.

При первичном заражении бактерии клетки *Mtb* способны адаптироваться к неблагоприятным условиям внутри макрофага, в том числе, к воздействию слабокислых значений pH (5.8–6.5). На более поздних сроках заражения наблюдается формирование гранулем, представляющих собой некротическое ядро, а из-за плохой перфузии внутренность гранулемы становится гипоксической [79, 80]. Несмотря на активность иммунной системы хозяина, какое-то количество клеток возбудителя туберкулеза избегает гибели, в частности, из-за затрудненного доступа клеток хозяина во внутренние слои гранулемы. Очевидно, что триггерный фактор, индуцирующий процесс перехода микобактерий в состояние покоя, нужно искать среди первичных стрессорных воздействий, появляющихся на пути патогена в организме хозяина.

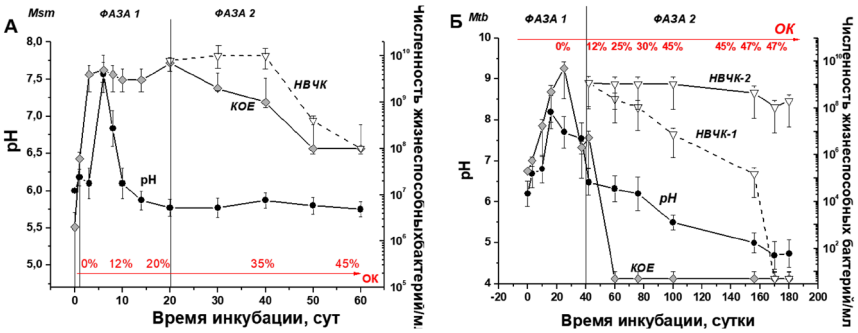


Рис. 1. Образование «некультивируемых» овоидных клеток *M. smegmatis* (А) и *M. tuberculosis* (Б) при постепенном снижении pH среды в стационарной фазе.

Шкала ОК – прирост доли клеток с измененной морфологией, ОК – овоидные клетки.

Фаза-1 – инкубация на качалке при 37^{0}С, Фаза-2 – инкубация при комнатной температуре без перемешивания. НВЧК-1 – количество жизнеспособных клеток, оцененное с помощью метода конечных разведений в свежей жидкой среде; НВЧК-2 – количество жизнеспособных клеток, оцененное с помощью метода конечных разведений с использованием супернатанта активных культур.

Основываясь на том, что снижение pH является основным фактором, ограничивающим рост *Mtb* в макрофагах [102], и одним из первых стрессорных воздействий, с которым сталкивается патоген при попадании в организм хозяина, была разработана модель образования покоящихся форм микобактерий в условиях стационарной фазы культур *Mtb* и *Mycobacterium smegmatis* (*Msm)* при постепенном снижении значения pH среды [18, 103]. Эта модель основана на явлении самозакисления окружающей среды за счет метаболизма глицерина в среде роста микобактерий. При этом наблюдается накопление органических кислот вследствие чего значение pH в среде плавно снижалось до 5.8–5.7.

Одновременно со снижением pH среды в пост-стационарной фазе (7–9 суток для *Msm* и после 40 суток для *Mtb*) наблюдается появление морфологически измененных клеток (рис. 1, 2). Эти бактериальные клетки характеризовались овоидной формой, утолщенной слоистой клеточной стенкой и электронноплотной цитоплазмой (рис. 2 г–и) [18, 103]. Подобные формы *Mtb* с овоидной и коккоидной морфологией ранее были изолированы Хоменко с соавтр. из инфицированных тканей животных [65].

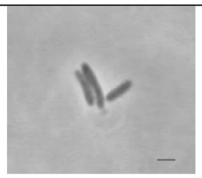
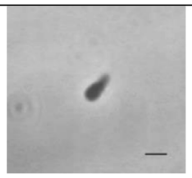
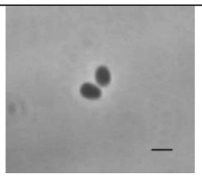
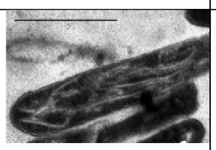
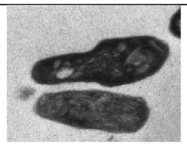
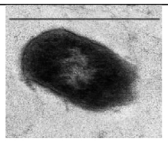
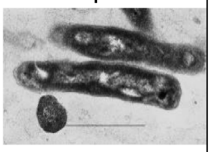
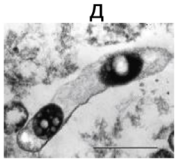
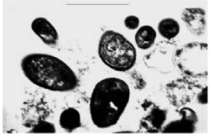
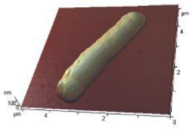
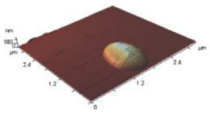
Стадии развития культур	**Вегетативный рост 1**	**Начальная стадия покоя 2**	**Глубокий покой 3**
Фазово-контрастная микроскопия Длина масштабной метки 2 мкм *M. smegmatis*	 а	 б	 в
Электронная микроскопия тонких срезов *M. smegmatis*	 г	 д	 е
M.tuberculosis Длина масштабной метки 2 мкм	 ж	 з	 и
Атомно- силовая микроскопия клеток *M. smegmatis*	 к		 л

Рис. 2. Вид микобактерий при фазово-контрастной микроскопии (а, б, в для *M. smegmatis*), электронной микроскопии (г, д, е для *M. smegmatis* и ж, з, и для *M. tuberculosis*) и атомно-силовой микроскопии (к, л для *M. smegmatis*).

1 – клетки логарифмической фазы роста (2 сут. культивирования для *M. smegmatis* и 10 суток для *M. tuberculosis*), 2 – переходные формы (20 сут. для *M. smegmatis* и 40 сут. для *M. tuberculosis*), 3 – покоящиеся клетки микобактерий (60 сут).

Длина масштабной метки: (а–и) – 2 мкм.

Согласно данным атомно-силовой микроскопии (рис. 2ж, 2з), размеры активно размножающихся клеток (3.7×0.8 мкм) были больше размеров клеток с измененной морфологией (1.2×0.9 мкм) (рис. 2). Степень снижения значения pH (ΔpH) культуры влияла на количество образующихся овоидных клеток бактерий. Высокая доля морфологически измененных клеток *Msm* (35% овоидных форм и 30% переходных форм) была зафиксирована при плавном снижении значения pH в культуре на 2.5–3 единицы [103]. Степень, и скорость снижения pH культуры в стационарной фазе влияют на формирование овоидных клеток *Msm*. Способность клеток пост-стационарных культур *Mtb* расти на плотных средах (КОЕ/мл) менялась синхронно с изменением pH среды роста (рис. 1а, 1б) [18]. Отсутствие овоидных клеток с поврежденным барьером проницаемости мембраны в длительно инкубируемых культурах *Mtb* свидетельствовало о сохранении их потенциальной жизнеспособности, несмотря на наблюдаемое резкое снижение числа КОЕ (рис. 1б). Культуры *Mtb* с КОЕ = 0 в возрасте 60 сут, содержащие овоидные формы, были способны восстанавливать рост при культивировании в жидкой среде Сотона («спонтанная реактивация») до 3×10^8 клеток/мл, подсчитанных методом наиболее вероятного числа клеток (НВЧК) (рис. 1б, НВЧК 1). При дальнейшей инкубации культур *Mtb* доля клеток, способных к возобновлению роста в жидкой среде, снижалась и приближалась к нулю через 180 сут. Для реактивации таких бактерий требовалось внесение супернатанта (СН), полученного из активно растущих культур *Mtb*. Число клеток, восстановленных в присутствии СН, практически не менялось на протяжении 180 сут культивирования (рис. 1б, НВЧК 2) [18].

Овоидные клетки *Mtb* обладали повышенной устойчивостью к термообработке, в отличие от вегетативных клеток. Число КОЕ-образующих реактивированных покоящихся микобактерий после прогревания при 70 ^{0}C в течение 10 мин было в 50 раз меньше по сравнению с контролем без прогревания, в то время как вегетативные клетки практически не восстанавливались после воздействия той же температуры [18]. Также покоящиеся овоидные клетки были также более устойчивы к воздействию антибиотиков: гигромицина, тетрациклина и рифампицина, по сравнению с метаболически активными клетками. В частности, при воздействии 50 мкг/мл гигромицина на клетки *Msm* (10^8 КОЕ/мл) в течение 24 ч, остаточная выживаемость составляла 10^7 КОЕ/мл для покоящихся форм, тогда как для вегетативных клеток 10^2 КОЕ/мл [103].

Таким образом, овоидные формы микобактерий, полученные экспериментально в модели постепенного закисления, соответствуют

всем вышеприведенным критериям, применяемым для характеристики микобактерий на стадии латентного ТБ.

Важно, что овоидные «некультивируемые» формы *Mtb,* образующиеся в результате постепенного закисления среды, обладают инфекционным потенциалом *in vivo*, несмотря на их изначальную существенную некультивируемость. Известно, что внутритрахеальное заражение мышей всего 10^3 активными клетками *Mtb* приводит к полной гибели даже генетически резистентных мышей на 4-м месяце инфекции [104].

Для оценки инфекционного потенциала овоидных покоящихся клеток *Mtb*, полученных в опытах *in vitro*, ими были заражены внутритрахеально мыши двух имбредных линий с разной устойчивостью к ТБ в дозе 10^5 бактерий на мышь. Наблюдения за динамикой прогрессирования инфекции проводили в течение 1.5 лет. После инфицирования мышей покоящимися микобактериями не наблюдалось никаких видимых признаков заболевания вплоть до 180 сут, когда мыши, чувствительные к ТБ (линия I/St) проявили первые признаки болезни (2–3% потери массы тела) [105, 106]. Как показано на рис. 3а, количество бактерий (КОЕ) в легких животных через 8 мес. после заражения увеличивалось в 100 раз у чувствительных к ТБ мышей I/St и в 10 раз у относительно резистентных мышей B6. Кроме того, наблюдалась диссеминация инфекции в селезенках у мышей обеих линий [105].

Отметим, что инфекция, вызванная покоящимися микобактериями, развивалась намного медленнее, чем инфекция, вызванная активно растущими бактериями логарифмической фазы роста [106]. Через год после заражения мыши линии B6 внешне выглядели здоровыми, количество клеток *Mtb* (КОЕ) в их легких (~10^5 на орган) не менялось в период между 8 и 12 мес. инфекции (Рис. 3б). Спустя 1.5 года у устойчивых к ТБ мышей линии B6 по достижению ранних этапов старения происходило накопление в органах типичных активных клеток *Mtb*. А чувствительные к ТБ мыши линии I/St к этому времени начали погибать (рис. 3б) [105]. Эти результаты пока являются первым и единственным доказательством того, что микобактерии в состоянии длительного покоя и некультивируемости действительно обладают инфекционным потенциалом.

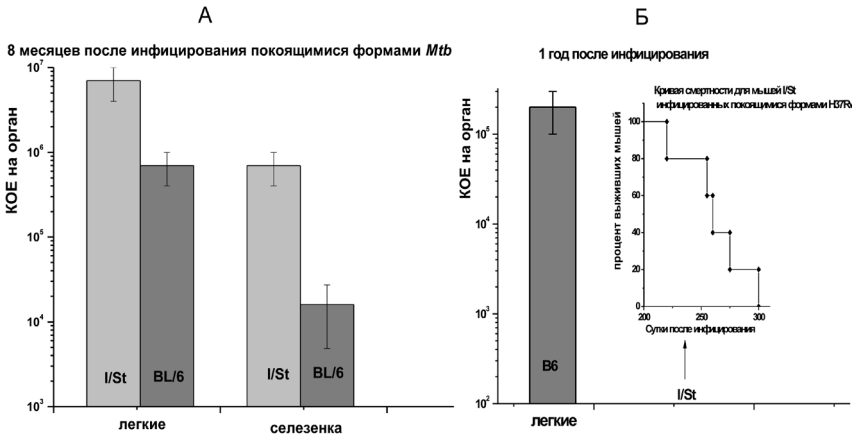


Рис. 3. Развитие инфекции у мышей, вызванной покоящимися формами *M. tuberculosis*.

Мыши B6 и I/St были инфицированы покоящимися формами *M. tuberculosis*, и количество КОЕ в органах было определено после 8 (А) и 12 (Б) месяцев заражения.

V. БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТОК МИКОБАКТЕРИЙ

При переходе микобактерий *Mtb* и *Msm* из палочковидной формы в овоидную в процессе постепенного закисления внешней среды в пост-стационарных культурах наблюдалось заметное торможение метаболической активности. Значительно снижались активности синтеза РНК и ДНК, оцененные по включению их радиоактивных предшественников, а также сильно снижался уровень внутриклеточных АТФ и цАМФ при формировании овоидных покоящихся клеток с «некультивируемым» фенотипом [18, 103, 107, 108]. Отсутствие восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCPIP) и метиленового синего овоидными формами *Msm* и *Mtb* указывало на ингибирование в них дыхания [107, 109, 110].

Несмотря на то, что концентрация динуклеотидов в покоящихся бактериях была в 10 раз меньше, чем в активных, соотношение НАД/НАДН оказалось практически одинаково [109], что может свидетельствовать в пользу протекания реакций, вследствие которых происходит равновесная генерация и расходование НАДН в

покоящихся микобактериях. Хотя уровни АТФ (особенно для *Mtb*), цАМФ, НАД, НАДН и активность дыхательной цепи были существенно снижены у микобактерий в состоянии покоя, но все-таки детектировались, можно предположить, что покоящиеся микобактерии обладают остаточным метаболизмом, возможно, необходимым для поддержания жизнеспособности клетки в период длительного покоя.

ЗАПАСЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ

В покоящихся микобактериях не происходит основных биосинтетических процессов, что следует из отсутствия синтезов белка, РНК и ДНК. Однако, допущение наличия низкого уровня метаболизма в период покоя предполагает расходование неких эндогенных метаболитов, накопленных микобактериями при переходе в состояние покоя, которые могут участвовать в поддержании минимального метаболизма покоящихся микобактерий за счет катаболических реакций. В этой связи было проведено исследование экстрагированных из покоящихся клеток *Msm* гидрофобных и гидрофильных метаболитов методом ЯМР.

В спектре H^1-ЯМР соединений, экстрагированных водно-метанольной смесью из овоидных клеток *Msm* был выявлен значительный дуплетный сигнал с химсдвигом 5.18-5.19, специфичный для аномерных протонов известного дисахарида трегалозы. Соответствующие пики отсутствовали в экстракте вегетативных клеток бактерий. Методами ТСХ и ЯМР было продемонстрировано значительное возрастание количества этого дисахарида в процессе перехода бактерий в состояние покоя [111]. Содержание трегалозы в покоящихся клетках *Msm* составляло 16–18 % от сухого веса клеток. В активных клетках *Msm* содержалось гораздо меньше свободной трегалозы (0.35±0.12 мкг/мг влажного веса клеток) в отличие от покоящихся форм (6.5±0.4 мкг/мг влажного веса клеток), находящихся в состоянии покоя 75 сут [111].

В протеоме покоящихся форм *Msm* были обнаружены ферменты синтеза трегалозы [109]. Уровень транскрипции генов биосинтеза трегалозы во время перехода микобактерий в состояние покоя постепенно возрастал [111]. В протеомном профиле овоидных покоящихся клеток *Mtb* было также обнаружено возрастание количества ферментов, участвующих в синтезе трегалозы (особенно Rv2006/otsB1), при этом анализ водно-метанольного экстракта клеток *Mtb* выявил увеличение содержания трегалозы в 4–5 раз в овоидных клетках, находившихся в состоянии покоя 4.5 месяца (2.2±0.3 мкг/мг влажного веса клеток) по сравнению с вегетативными (0.4±0.15 мкг/мг влажного веса клеток).

Для подтверждения роли трегалозы в поддержании покоящегося состояния было исследовано поведение клеток *Msm* в состоянии длительного покоя путем варьирования концентрации внутриклеточной трегалозы. В связи с этим был сконструирован штамм *Msm*, гиперэкспрессирующий ген MSMEG_4535 (штамм pES_MSMEG_4535), который кодирует трегалазу, осуществляющую гидролиз трегалозы до глюкозы [111]. Этот подход обеспечивал изменение содержания трегалозы внутри клетки. Микобактерии штамма с гиперэкспрессией трегалазы не отличались от клеток контрольного штамма во время активного роста культуры и были способны к формированию покоящихся клеток. При исследовании овоидных клеток этого штамма в период их длительного хранения было обнаружено постепенное снижение концентрации внутриклеточной трегалозы до практически нулевых значений к 75 сут. инкубации в отличие от контрольного штамма (рис. 4). Параллельно с этим, в культуре покоящихся клеток штамма с гиперэкспрессией трегалазы увеличивалось количество погибших бактерий, выявленное методом НВЧК[111], что свидетельствует о корреляции между концентрацией трегалозы в покоящихся клетках микобактерий и их жизнеспособностью в период длительного покоя.

Было обнаружено, что при реактивации покоящихся микобактерий, хранившихся в течение 3.5–5 месяцев в закисленных культурах при комнатной температуре, и перенесенных в свежую жидкую среду наблюдается выраженная лаг-фаза (до 6–8 часов). В этой фазе не происходит активных биосинтетических процессов, что следует из отсутствия дыхания бактерий, отсутствия синтезов белков и РНК [110]. Можно предположить, что в этой фазе происходят катаболические процессы, в которые вовлечены запасенные в покоящихся клетках эндогенные метаболиты. Поскольку в покоящихся микобактериях было обнаружено значительное количество трегалозы, был изучен ее метаболизм в клетках *Msm* в процессе реактивации покоящихся микобактерий. Как и предполагалось, уровень трегалозы резко снижался в начальный период реактивации (1–5 ч), что имело место задолго до начала синтезов РНК (8–12 ч), при этом наблюдалось резкое повышение концентрации глюкозы, что, по-видимому, связано с гидролизом трегалозы и образованием свободной глюкозы. В период до 20 ч деление клеток отсутствовало [111].

Поскольку гидролиз трегалозы осуществляется ферментом трегалазой, была оценена активность этого фермента в процессе реактивации. Действительно, в начале реактивации (через 2 часа) происходит значительное увеличение активности трегалазы (рис. 5а), что коррелирует со скачком концентрации глюкозы и быстрым

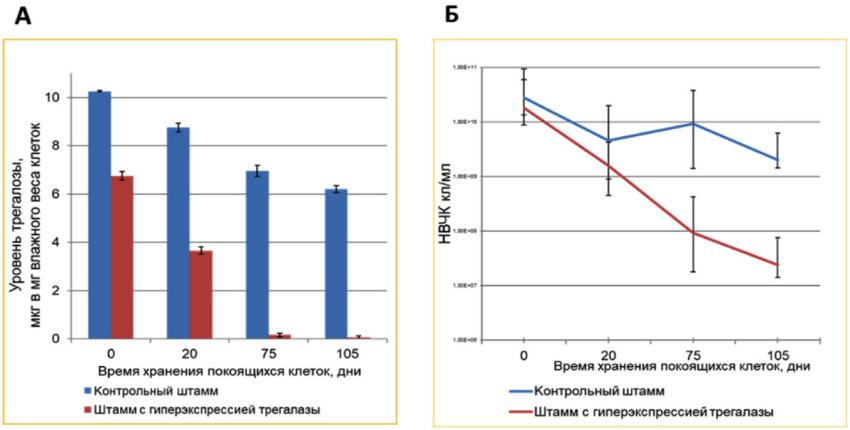


Рис. 4. Корреляция между уровнем внутриклеточной трегалозы (А) и жизнеспособностью (Б) покоящихся овоидных форм *M. smegmatis* при длительном хранении микобактерий в слабокислых условиях.

Жизнеспособность бактерий оценивали при их росте в жидких средах (НВЧК), концентрацию трегалозы определяли методом ВЭЖХ.

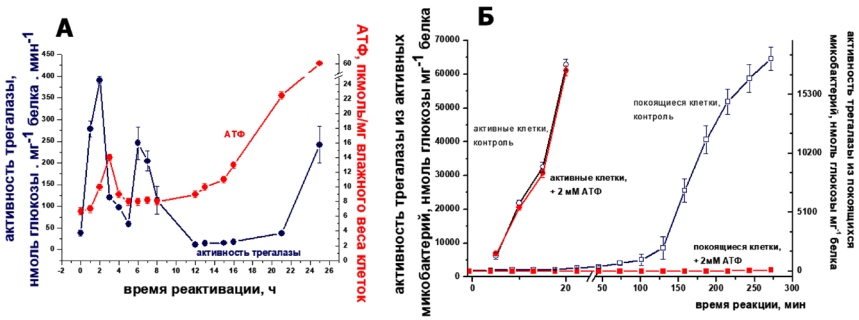


Рис. 5. Активность трегалазы и уровень АТФ.

А. Динамика изменения активности трегалазы и концентрации АТФ в реактивирующихся клетках *M. smegmatis* из состояния покоя.

Б. Способность трегалазы из покоящихся микобактерий к самоактивации *in vitro*.

● – активность трегалазы из активно растущих микобактерий, ■ – активность трегалазы из покоящихся микобактерий; открытые символы – без АТФ, закрашенные символы – в присутствии 2 мМ АТФ в реакционной смеси.

снижением концентрации трегалозы. Затем активность трегалазы снижалась и через 5–7 часов снова увеличивалась. Третий подъем активности трегалазы через 24 ч (рис. 5а) совпал с началом размножения микобактерий и эта активность в дальнейшем поддерживалась на постоянном уровне в течение логарифмической фазы роста [111].

Для объяснения выявленной флуктуации в активности трегалазы, последняя была изучена в экстрактах активных и покоящихся микобактерий *in vitro*. В частности, определяли влияние широкого диапазона концентраций АТФ на активность трегалазы, полученной из активных и покоящихся клеток микобактерий. Было обнаружено, что небольшие концентрации АТФ (2 мМ) предотвращают активацию этого фермента в экстракте из покоящихся микобактерий (рис. 5б). При этом на трегалазу из активных микобактерий эти концентрации АТФ не действовали, и ее активность ингибировалась только в присутствии 20 мМ АТФ. Таким образом, флуктуации в активности трегалазы при реактивации покоящихся микобактерий можно объяснить активацией этого фермента, связанной с флуктуациями концентрации внутриклеточного АТФ. Действительно, было обнаружено, что при повышении уровня АТФ в первые 2 ч реактивации снижается активность трегалазы (рис. 5а). Когда начинается активный рост (24 ч) трегалаза утрачивает чувствительность к низким концентрациям АТФ, аналогично ситуации с трегалазой из активно растущих бактерий [111].

Таким образом, можно предположить, что такая чувствительность трегалазы в покоящихся микобактериях к низким концентрациям АТФ обеспечивает поддержание внутриклеточной концентрации АТФ на низком и постоянном уровне в период покоя по механизму обратной связи. Так, если концентрация АТФ сильно снижается (становится ниже, чем 2 мМ), то она восполняется за счет гидролиза трегалозы с образованием глюкозы и далее АТФ, предположительно, за счет субстратного фосфорилирования в гликолизе, ферменты которого нами обнаружены в полном составе в протеомном профиле покоящихся микобактерий. И наоборот, когда уровень АТФ достигает определенного предела (>2 мМ), а условия для дальнейшей реактивации не благоприятны, происходит ингибирование трегалазы, и снижение уровня АТФ до поддерживающих значений. Такой механизм обратной связи может регулировать энергетические потребности ПМ и минимальный уровень метаболизма в условиях длительного хранения при отсутствии синтеза АТФ при окислительном фосфорилировании.

Другой особенностью покоящихся клеток *Msm* было накопление (как в клетках, так и в культуральной жидкости) больших количеств красного флюоресцирующего пигмента, спектры поглощения которого были характерны для порфиринов [112]. Порфириновая природа обнаруженного пигмента была подтверждена H^1-ЯМР анализом экстрактов покоящихся овоидных клеток *Msm* [112]. Данные ЯМР, а также масс-спектроскопии позволили заключить, что основным пигментом, накапливающимся в покоящихся формах *Msm* является тетраметиловый эфир копропорфирина III. Оценка количества порфиринов в культурах *Mtb* продемонстрировала, что активно растущие вегетативные микобактерии содержат 0,033±0,01 нг порфиринов/мг влажного веса клеток, а покоящиеся формы – 0,25±0,05 нг порфиринов/мг влажного веса клеток, т.е. в 6 раз больше. В овоидных клетках *Msm* содержание порфиринов было выше: 7±0,05 нг/мг влажного веса клеток в активных бактериях и 300±0,1 нг/мг в покоящихся формах.

Протеомный анализ овоидных клеток *Msm* выявил в них значительное присутствие ферментов синтеза порфирина (порфибилиногендеаминазы; дегидратазы дельта-аминолевулиновой кислоты; декарбоксилазы уропорфириногена, в отличие от вегетативных клеток микобактерий [109]. Даже после многочисленных экстракций смесью хлороформ-метанол-вода покоящихся клеток они остаются окрашенными в бежевый цвет и этот остаточный краситель извлекается подкисленным метанолом и имеет «порфириновый» спектр поглощения.

Таким образом, можно предположить, что этерифицированные гидрофобные формы порфиринов встраиваются в зоны расположения миколовых кислот в клеточной оболочке, усиливая плотность и прочность их упаковки, а неэтерифицированные (гидрофильные) порфирины содержащие до 8 карбоксильных групп на молекулу, взаимодействуя с поверхностью разных полимеров от полисахаридов оболочки до белков цитоплазмы стабилизируют и консервируют клеточные структуры, подготавливая их к переживанию неблагоприятных условий.

Также, предположительно, накопление порфиринов в покоящихся микобактериях может способствовать защите клеток от воздействия окислительного стресса, однако их роль в этих процессах пока достоверно не установлена. Тем не менее, известно, что порфирины и их комплексы с металлами, содержащие 2,6-ди-трет-бутилфенол, могут проявлять антиоксидантные свойства и участвовать в защите от актив-

ных форм кислорода и нуклеофильных соединений [113]. Подобное явление антиоксидантного действия порфиринов продемонстрировано для эукариотических клеток [114], митохондрий [115] и бактерий [116]. Конкретные механизмы антиоксидантного действия порфиринов пока не очевидны, но металлсодержащие порфирины структурно и, вероятно, функционально, схожи с активными центрами гем-содержащих оксидоредуктаз, участвующих в реакциях окисления органических субстратов [114]. Кроме этого, накопленные порфирины в покоящихся микобактериях могут быть использованы в качестве предшественников для биосинтетических процессов в период реактивации.

ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ

Анализ протеомного профиля микобактерий может дать представление о метаболических процессах, которые потенциально активны в клетках в состоянии покоя. Ряд исследований с использованием экспериментальных моделей покоя выявили значительное количество различных белков в клетках [98, 117–120]. Однако, эти эксперименты проводились на бактериях, пребывающих в состоянии покоя незначительное время. В тоже время, с использованием вышеописанной модели *in vitro* постепенного закисления внешней среды при проведении протеомного анализа покоящихся форм как *Mtb*, так и *M. smegmatis*, было выявлено, что микобактерии сохраняют также значительное разнообразие неповрежденных белков несмотря на длительное пребывание (4–13 месяцев) в состоянии покоя, в отсутствие деления и синтезов *de novo* [107, 109], что сильно отличается от уровня мРНК транскриптов, который сильно снижен в состоянии покоя [121].

С применением двумерного электрофореза различных фракций клеток *Mtb* и последующей MALDI масспектроскопии были идентифицированы около 350 различных белков (суммарно во фракциях цитозоля и мембран) для вегетативных клеток, для покоящихся клеток этот показатель составлял 155 различных белков для ранней фазы покоя и 192 белка для длительно хранившихся ПМ. Сравнение паттернов двумерных форезов и идентификация белков выявило достаточно близкое распределение белков в цитозоле вегетативных и покоящихся клеток *Mtb* по различным категориям KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). В то же время этот анализ распределения белков мембранной фракции выявил различия. Обращает на себя внимание уменьшение доли белков в категории «cell wall

processes» во фракции мембран у покоящихся клеток по сравнению с вегетативными, что вероятно связано с отсутствием репликации в ПМ [107]. Наблюдается увеличение доли белков в категории «intermediary metabolism and respiration», за счет белков биосинтеза глютамина, гликолитического пути, белков цикла Кребса, глиоксилатного пути, ферментов шикиматного пути биосинтеза фенольных соединений. Для отдельных ферментов овоидных покоящихся форм *Msm* была подтверждена энзиматическая активность *in vitro* [109].

В работе Циммерманн с соавторами высказано предположение о использовании микобактериями при анаэробиозе восстановительной цепи цикла трикарбоновых кислот от пирувата до сукцината в обратном направлении через малат и фумарат, в результате этого ожидается внеклеточное накопление сукцината. Подобный механизм позволяет окислить восстановительные эквиваленты, образованные в гликолизе, а за счет электрогенного выброса сукцината генерировать мембранный потенциал [122]. Последнее может быть важным для поддержания уровня АТФ и жизнеспособности покоящихся микобактерий в период длительного хранения. Поскольку в протеоме покоящихся форм *Mtb* ферменты прямого направления цикла Кребса изоцитратдегидрогеназа (Rv0066) и цитратсинтаза (Rv0889) отсутствуют [107], то можно предположить, что несмотря на отсутствие анаэробных условий в процессе образования покоящихся форм в модели закисления внешней среды, возможно цикл трикарбоновых кислот функционирует подобным образом в обратном направлении.

Увеличение доли белков во фракции «virulence, detoxification, adaptation» отражает развитие адаптации к неростовым условиям и включение защитных механизмов при переходе клеток в покоящееся состояние. Сравнение протеома и идентификация белков выявили суммарно 90 белков во фракциях цитозоля и мембран, представленных в протеоме покоящихся клеток и отсутствующих в вегетативных клетках [107]. Это количество значительно превышает число дифференциально эспрессируемых белков в других моделях покоя *Mtb*: нерепликативного состояния в анаэробиозе (21 белок) [123, 124]; модели голодания в бедной среде (7 белков) [98]; модели поздней стационарной фазы (10 белков) [118], что указывает на другое, возможно, более глубокое состояние покоя бактерий в исследуемой модели.

Обнаружено, что в протеоме покоящихся микобактерий в отличие от протеома активно делящихся клеток хорошо представлены ферменты, участвующие в процессах деградации жиров, белков и полисахаридов. Для протеома покоящихся микобактерий было

характерно выраженное разнообразие энзимов, участвующих в инактивации активных форм кислорода (АФК): тиолпероксидаза, каталаза/пероксидаза, супероксиддисмутазы, альдо/кеторедуктаза, алкилгидропероксидаза, алкилгидропероксидредуктазы [107, 109].

Известно, что для защиты от окислительного стресса во многих бактериях синтезируется глутатион, который обладает токсичностью для микобактерий [125]. Однако в микобактериях имеются пути синтеза метаболитов, способных, как и глутатион восстанавливать окисленные биомолекулы. К таким веществам принадлежат тиоредоксин и микотиол. Ферменты, участвующие в синтезе микотиола, обнаружены в протеоме покоящихся форм *Msm* [109], но не *Mtb*. В покоящихся клетках *Mtb* был выявлен другой функциональный эквивалент глутатиона – тиоредоксин, а именно тиоредоксин С (Rv3914), а также была обнаружена тиоредоксин-редуктаза (Rv3913), участвующая в восстановлении тиоредоксина [107].

В протеомном профиле покоящихся овоидных микобактерий было выявлено большое разнообразие шаперонов (dnaJ; groEL2, dnaK, GroL, groEL, hspX и другие), способных защищать белки от агрегации и денатурации, а также участвующих в процессах их репарации [107, 109]. В ПМ обеих бактерий обнаруживаются бактериоферритины – белки, участвующие в запасании железа, важнейшего элемента для жизнедеятельности микобактерий. Также в ПМ увеличена доля ферментов, входящих в пентозофосфатный путь, что может обеспечивать клетку восстановленным НАДФ, используемым совместно с глютатион-перокидазой и каталазой для защиты клеточных компонентов от активных радикалов. Увеличено также содержание ферментов гликолитического пути. Обнаружены в значительном количестве цитохромная лактат дегидрогеназа и ферредоксин PdxC. Обнаружено накопление неорганической пирофосфатазы Ppa. Выявлены белки, участвующие в синтезе глутамина, микотиола (участвует в детоксикации), рибофлавина, пиридоксин/пиридоксаля и гистидина. Кроме этого, выявлены ферменты гликолитического пути, который в отсутствие работы дыхательной цепи может участвовать в синтезе макроэргов [107, 109].

Обнаружены белки, связывающиеся с ДНК с возможной ролью компактизации хромосомы (Rv0341 и Rv2986c). Несмотря на отсутствие процессов репликации, транскрипции и трансляции в покоящихся клетках, в них были обнаружены некоторые транскрипционные регуляторы. Большинство обнаруженных регуляторов оказалось репрессорами, что отражает ингибирование метаболических процессов при переходе в состояние покоя. Среди нескольких регуляторных

белков можно выделить негативный регулятор транскрипции Rv2711. Помимо того, обнаружены специфические регуляторы адаптации к стрессу (MprA Rv0981/MSMEG_5488; phoP/Rv0757; Wag31/Rv2145) [107, 109].

Обнаружены белки, связывающиеся с ДНК с возможной ролью компактизации хромосомы (Rv0341 и Rv2986c). Несмотря на отсутствие процессов репликации, транскрипции и трансляции в покоящихся клетках, в них были обнаружены некоторые транскрипционные регуляторы. Большинство обнаруженных регуляторов оказалось репрессорами, что отражает ингибирование метаболических процессов при переходе в состояние покоя [107, 109].

Среди нескольких регуляторных белков можно выделить негативный регулятор транскрипции Rv2711. Помимо того, обнаружены специфические регуляторы адаптации к стрессу (MprA Rv0981/MSMEG_5488; phoP/Rv0757; Wag31/Rv2145) [107, 109].

Среди белков, участвующих в транспортной функции мембраны, найдены транспортер, обеспечивающий транспорт липополисахарида через мембрану и транспортер, участвующий в осмопротекции (транспорт осмопротекторов внутрь клетки). Как было упомянуто выше, в покоящихся микобактериях выявлены белки, участвующие в синтезе трегалозы и порфирина (см. выше) [107, 109].

В протеомном профиле покоящихся микобактерий обнаружено большое количество белков с неизвестной функцией, отсутствующих у активных бактерий. Среди них наиболее представленными являются Rv0341[107] (для *Mtb*) и MSMEG_6227 [109] (для *Msm*), которые, как было выяснено, образуют комплексы с ДНК различной молекулярной массы. При этом, в отличие от активных клеток в протеоме ПМ практически отсутствовали белки, участвующие в следующих биосинтетических путях: синтезе пуринов, миколовых кислот, лейцина, фенольных гликолипидов, жирных кислот, фосфатидилинозитола, биосинтезе клеточной стенки, а также в метаболизме ДНК.

Большая представленность ферментов, участвующих в деградации основных полимеров клетки, позволяет высказать предположение, что в покоящихся клетках протекают катаболические реакции, что, возможно, позволяет использовать продукты гидролиза в поддержании жизнеспособности покоящейся бактерии довольно длительное время, используя имеющиеся ферменты и метаболические пути (например, в отсутствии дыхания покоящиеся клетки могут использовать гликолитический путь для образования макроэргических соединений). В состоянии подавления биосинтетических процессов сохраняющиеся ферменты и белки могут быть рассмотрены также в

качестве запасенных и необходимых для быстрого запуска процесса реактивации при наступлении благоприятных для роста условий. Таким образом, протеомные исследования позволили выявить сохранность и разнообразие белков и ферментов в длительном покоящемся состоянии микобактерий. Среди таких белков существенно представлены ферменты, обеспечивающих защиту клеток от стрессовых воздействий

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛОМНОГО ПРОФИЛЯ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ *M. SMEGMATIS*

Для характеристики возможных биохимических реакций, протекающих в бактериальной клетке в период покоя, было проведено метаболическое профилирование [126] покоящихся клеток *M. smegmatis* с использованием вышеприведенной модели медленного закисления. Было выявлено, что несмотря на длительное (2 месяца) метаболически-неактивное покоящееся состояние в клетках *M. smegmatis* определяется достаточно большое количество накопленных ключевых метаболитов [110], что может свидетельствовать о сохранении известной метаболической активности у ПМ. При более коротких временах покоя с использованием модели гипоксии было также отмечено, что лишь около 20% метаболитов в клетках *M. smegmatis* снижается в состоянии покоя [122]. Однако, в настоящее время трудно однозначно ответить на вопрос, могло ли наблюдаемое присутствие значительного количества метаболитов с высокой концентрацией быть следствием метаболических реакций, происходящих в состоянии покоя микобактерий, или эти соединения просто были запасены и не расходовались в состоянии покоя. В пользу второго предположения свидетельствует тот факт, что концентрации ок. 79% обнаруженных метаболитов уменьшались при реактивации покоящихся клеток, что, в свою очередь, могло быть связано с их утилизацией в инициированных реактивационных метаболических процессах. Однако полностью исключить протекания метаболических процессов с низкой скоростью в состоянии покоя все же нельзя. Как отмечалось выше, протеомный анализ покоящихся клеток *M. smegmatis* достоверно демонстрирует наличие ряда интактных белков (ферментов) после двухмесячного хранения клеток [109]. В частности, заметное накопление янтарной и фумаровой кислот в состоянии покоя может свидетельствовать о функционировании цикла ЦТК в реверсном направлении (см.выше), причем при реактивации концентрация этих кислот уменьшалась (рис. 6).

Рис. 6. Динамика изменения метаболитов в зависимости от времени реактивации покоящихся клеток *M. smegmatis*.

Представление тепловой карты метаболитов, аннотированных KEGG, изменяется с течением времени.

Обращает на себя внимание накопление молочной кислоты покоящимися клетками. Ферментирующая лактатдегидрогеназа не аннотирована в геноме *M. smegmatis* (так же, как и ее активность не была обнаружена) [109]. Можно предположить, что накопление лактата является результатом каких-то побочных реакций: например, как следствие превращения глицерина через метилглиоксаль. Промежуточный продукт катаболизма глицерина – метилглиоксаль, высокотоксичное соединение, способное вступать в реакцию с большим количеством нуклеофильных соединений клетки (например, соединения, содержащие амино- и тиол-функциональные группы) [127]. В метаболоме покоящихся бактерий сам метилглиоксаль не обнаруживается, но обнаруживается продукт его восстановления – лактальдегид (рис. 6), который, в свою очередь, может в дальнейшем повторно окисляться до молочной кислоты [127, 128]. Лактат, в свою очередь, может быть использован в качестве источника углерода. В геноме *M. tuberculosis* аннотированы две хинонзависимые лактатдегидрогеназы, принадлежащие к флавинсодержащим ферментам, которые катализируют реакцию окисления молочной кислоты в пировиноградную кислоту НАД-независимым образом [129]. Накопление глицерина в покоящихся клетках можно рассматривать как защитный механизм при снижении концентрации внутриклеточной воды. В целом бактериальные клетки в условиях стресса склонны к накоплению осмопротекторов – соединений, регулирующих приспособляемость клеток к осмотическому стрессу [130, 131]. К таким защитным осмолитам относятся (кроме вышеупомянутого глицерина): трегалоза, глюкоза, пролин, глутаминовая кислота [132]. Выше были приведены данные о накоплении трегалозы в клетках *M. smegmatis* при их переходе в состояние покоя [111]. Однако метаболомный анализ обнаруживает в этих формах и накопление метаболита трегалозы – трегалозо-6-фосфат [110]. Следует также отметить, что баланс трегалоза/трегалозо-6-фосфат может зависеть от осмолярности окружающей среды [133].

Накопленные в период покоя аминокислоты: l-Val, l-Ala, l-Asn, l-Tyr, l-Ser, l-Trp, l-Pro, l-Glu и аминокислоты, [110] также предположительно могут служить дополнительным источником энергии и углерода, необходимых для реактивации.

Другим маркером состояния покоя является метиловый эфир копропорфирина, концентрация которого значительно снижается в фазу заметной активации метаболизма (10–26 ч) (рис. 6) [110]. Предполагается, что это гидрофобное соединение, накапливающееся в

мембранных фракциях микобактерий, играет цитопротекторную функцию [112] и, возможно, может участвовать в стабилизации мембран микобактерий.

Более детальное исследование изменения метаболома при реактивации покоящихся клеток позволило установить, что при этом происходит, в первую очередь, ускорение следующих метаболических процессов: биосинтез вторичных метаболитов, пуриновый и пиримидиновый обмен, обмен глицерофосфолипидов и жирных кислот. Кластеризация метаболитов, отображенная на тепловой карте (рис. 6), позволила различать соединения по их поведению при реактивации: наибольший кластер (79%) демонстрирует метаболиты, которых много в покоящихся клетках, и их концентрация уменьшается в течение времени реактивации. К этой группе метаболитов относится большинство соединений первичного метаболизма: НАД, НАДН, пировиноградная кислота, фумаровая кислота, янтарная кислота, молочная кислота, глицерин, d-лактальдегид, трегалозо-6-фосфат, d-глюкоза, l-глутаминовая кислота. кислота, тетраметиловый эфир копропорфирина и т.д. Полученные данные свидетельствуют, что в процессе реактивации происходит постепенно возрастающая достаточно стохастическая активация набора реакций. Очевидно, запуск полного метаболизма происходит на более поздних стадиях реактивации по мере сборки всех биохимических путей [109].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как патогенные, так и непатогенные неспорообразующие микобактерии способны под воздействием стрессовых факторов, в частности при адаптации к постепенному закислению внешней среды *in vitro*, переходить в состояние длительного покоя, характерными признаками которого является низкая активность метаболизма клетки, отсутствие деления, устойчивость к ряду антибиотиков, выраженные морфологические изменения и потеря способности к росту на стандартных плотных средах («некультивируемость»). Такие покоящиеся формы способны к длительному выживанию в жидких средах без репликации. Важно, что инфицирование мышей полученными *in vitro* покоящимися формами *Mtb* приводило к развитию длительной (до 1.5 лет) хронической формы ТБ у животных, что позволяет считать, что такие формы, моделируют состояние латентного ТБ. Микобактерии в состоянии глубокого покоя характеризуются овоидной формой клетки со значительно утол-

щенной клеточной стенкой. У таких клеток мембранный потенциал ниже экспериментально детектируемого уровня отсутствуют процессы репликации, транскрипции и трансляции. Мембрана такой клетки содержит значительное количество метиловых эфиров копропорфирина [112, 134], предположительно выполняющих стабилизирующую роль.

После длительного пребывания в состоянии покоя в микобактериях сохраняется значительное количество стабильных белков, обладающих потенциальной ферментативной активностью. Все белки, обнаруженные в покоящихся клетках, можно разделить на три группы: 1) белки, которые экспрессируются при переходе от активного состояния в состояние покоя; 2) белки, которые являются «запасенными» и хранятся в покоящихся клетках для дальнейшей реактивации клеток в случае наступления благоприятных условий; 3) белки, которые являются функциональными и могут играть роль в поддержании клеточного метаболизма на достаточном для выживания уровне.

Анализ представленности белков третьей группы в протеоме и их ферментативной активности позволяет предположить, что в состоянии покоя в микобактериях может функционировать гликолитический путь с образованием пирувата, который может превращаться до сукцината в неполном цикле Кребса в реверсном режиме. Подобный механизм позволяет окислить восстановительные эквиваленты, образованные в гликолитическом пути, и обеспечить синтез АТФ, а за счет электрогенного выброса сукцината генерировать мембранный потенциал определённой величины.

Другой особенностью покоящихся микобактерий является хорошая представленность белков, ферментных систем защиты от стрессовых факторов и низкомолекулярных соединений, обеспечивающих защиту клетки в период отсутствия репликации. Среди таких механизмов можно выделить три группы. К первой группе относятся ферменты, участвующие в защите от окислительного стресса (дезактивация АФК и восстановление окисленных молекул), защите белков (шапероны) и ДНК (гистоноподобные белки).

Второй защитный механизм связан со значительным накоплением внутриклеточной трегалозы. Очевидно, что трегалоза стабилизирует покоящиеся клетки, о чем свидетельствует прямая корреляция между содержанием трегалозы и жизнеспособностью клеток в период длительного покоя. Кроме этого, трегалоза может рассматриваться как

запасенный энергетический субстрат, который расходуется в процессе реактивации покоящихся микобактерий за счет АТФ – зависимого перехода фермента трегалазы из латентного состояния в активное. Интересно, что обнаруженные особенности накопления и метаболизма трегалозы в ПМ выявляют сходство между полученными формами микобактерий и экзоспорами стрептомицетов и аскомицетовых дрожжей [135, 136].

Третий защитный механизм связан накоплением в мембранной фракции покоящихся клеток микобактерий (особенно у *Msm*) этерифицированных (гидрофобных) форм порфиринов, которые могут стабилизировать клеточные структуры, и таким образом способствовать их длительному сохранению в период покоя. В тоже время, обнаруженное явление накопления эндогенных порфиринов в покоящихся микобактериях дает предпосылки для разработки метода фотодинамической инактивации таких форм [134, 137].

Протеомный профиль покоящихся микобактерий обогащен ферментами, принимающими участие в гидролизе основных компонентов клетки (белков, пептидов, аминокислот, липидов и жирных кислот): гидролазы липидов, протеаз и пептидаз, полинуклеотидфосфорилаза, которая входит в состав РНК деградосом и участвует в деградации мРНК [107, 109]. Таким образом, в состоянии покоя в микобактериях обнаружено значительное количество гидролизующих ферментов, что, с одной стороны обеспечивает инактивацию поврежденных в результате стресса биомолекул, а с другой стороны продукты ферментативной активности этих энзимов могут участвовать в поддержании энергетического статуса и жизнедеятельности бактериальной клетки при длительном переживании в состоянии покоя, обеспечивая состояние, которое мы предлагаем называть «катаболическое выживание». Метаболомный анализ обнаруживает значительное содержание метаболитов в покоящихся клетках даже после длительного пребывания их в состоянии покоя, что также может указывать на протекание в покоящихся микобактериях «остаточного» метаболизма (за исключением биосинтеза макромолекул), что способствует поддержанию жизнеспособности клетки в период длительного покоя.

Таким образом, на момент написания данного обзора, покоящаяся, нереплицирующая микобактериальная клетка представляется в виде морфологически измененной формы, содержащей основные макромолекулы, стабилизированные и защищенные от повреждающих факторов соответствующим арсеналом низкомолекулярных веществ

и белков (рис. 7). Поскольку в таких клетках возможно протекание определенных метаболических реакций такую форму переживания следует отнести к гипобиозу.

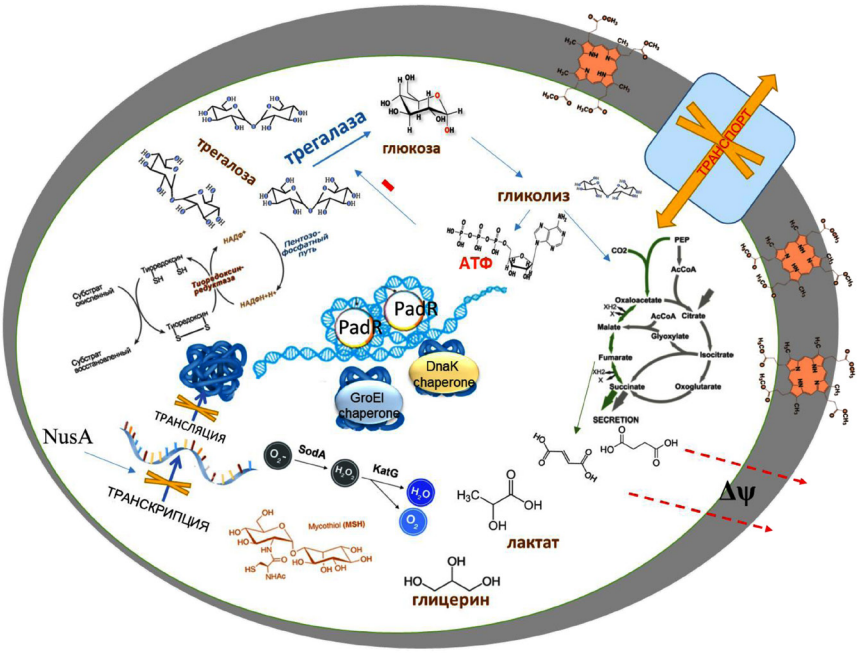


Рис. 7. Схема микобактерии в состоянии покоя.

Микобактерии в состоянии глубокого покоя характеризуются: овоидной формой клетки со значительно утолщенной клеточной стенкой; практически не детектируемым мембранным потенциалом; отсутствием процессов репликации, транскрипции и трансляции; увеличенным содержанием в мембране метиловых эфиров копропорфирина. Имеется остаточный уровень АТФ, цАМФ и поддержание постоянного соотношения НАД/НАДН. В цитоплазме обнаружены трегалоза, трегалозо-6-фосфат, глицерин, лактат, янтарная, фумаровая кислоты и другие метаболиты. Представлены практически все ферменты гликолиза, а также ферменты восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот, превращающих пируват до сукцината. За счет электрогенного выброса сукцината может генерироваться диффузионный мембранный потенциал. Имеются ферменты, участвующие в защите от окислительного стресса, детоксификации (супероксиддисмутаза, пероксидаза), а также шапероны, способные защищать белки от действия АФК, а также участвующие в процессах их репарации. Имеются пути синтеза веществ (тиоредоксина и микотиола), способных восстанавливать окисленные биомолекулы. Протеомный профиль покоящихся микобактерий обогащен ферментами, принимающими участие в гидролизе основных компонентов клетки (белков, пептидов, аминокислот, липидов и жирных кислот): гидролазы липидов; протеазы и пептидазы; полинуклеотидфосфорилаза, которая входит в состав РНК деградосом и участвует в деградации мРНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. (2005) Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 367 с.
2. Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Кряжевских Н.А., Сузина Н.Е., Воробьева, Л.И., Дуда В.И., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. (2009) Покоящиеся формы *Micrococcus luteus* и *Arthrobacter globiformis*, не прорастающие на стандартных средах, *Микробиология*, **78**, 456–468.
3. Chao, M.C., Rubin, E.J. (2010) Letting Sleeping dos Lie : Does Dormancy Play a Role in Tuberculosis?, *Annual Review of Microbiology*, **64**, 293–311.
4. Gutti, G., Arya, K., Singh, S.K. (2019) Latent Tuberculosis Infection (LTBI) and Its Potential Targets: An Investigation into Dormant Phase Pathogens, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **19**, 1627–1642.
5. Sussman, A.S. (1969) The dormancy and germination of fungus spores, *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **23**, 99–121.
6. Sussman, A.S., Halvorson, H.O. (1966) Spores: Their Dormancy and Germination, New York : Harper & Row, 354 p.
7. Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. (1977) Развитие актиномицетов, М.: Наука, 287 с.
8. Лойко Н.Г., Соина В.С., Сорокин Д.Ю., Митюшина Л.Л., Эль-Регистан Г.И. (2003) Образование покоящихся форм хемолитоавтотрофных бактерий *Thioalkalivibrio versutus* и *Thioalkalimicrobium aerophilum*, *Микробиология*, **72**, 328–337.
9. Bisset, K.A. (1950) Evolution in bacteria and the significance of the bacterial spore, *Nature,* **166**, 431–432.
10. Демкина Е.В., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. (2000) Образование покоящихся форм *Arthrobacter globiformis* в автолизирующихся суспензиях, *Микробиология*, **69**, 383–388.
11. Демкина Е.В., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И., Звягинцев Д.Г. (2000) Репродуктивные покоящиеся формы *Arthrobacter globiformis*, *Микробиология*, **69**, 377–382.
12. Эль-Регистан Г.И., Дуда В.И., Козлова А.Н., Митюшина Л.Л., Поплаухина О.Г. (1979) Изменение конструктивного метаболизма и ультраструктурной организации клеток *Bacillus cereus* под влиянием специфического ауторегуляторного фактора, *Микробиология*, **48**, 240–244.
13. Bakken, L.R., Olsen, R.A. (1987) The relationship between cell size and viability of soil bacteria, *Microbial Ecology*, **13**, 103–114.
14. McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D., Kjelleberg S. (1998) Nonculturability: adaptation or debilitation?, *FEMS Microbiology Ecology*, **25**, 1–9.
15. Сомова Л.М., Бузолева Л.С., Исаченко А.С., Сомов Г.П. (2006) Адаптивные изменения почвенных бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*, *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, **3**, 36–40.
16. Sikri, K., Tyagi, J.S. (2013) The evolution of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy models, *Current Science*, **105**, 607–616.
17. Wayne, L.G., Hayes, L.G. (1996) An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuber-*

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

culosis through two stages of non-replicating persistence, *Infection and Immunity*, **64**, 2062–2069.

18. Shleeva, M.O., Kudykina, Yu.K., Vostroknutova, G.N., Suzina, N.E., Mulyukin, A.L., Kaprelyants, A.S. (2011) Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification, *Tuberculosis*, **91**, 146–154.
19. Oliver, J.D. (2009) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, **34**, 415–425.
20. Kaprelyants, A., Gottschal, J., Kell, D. (1993) Dormancy in non-sporulating bacteria, *FEMS Microbiology Reviews,* **104**, 271–285.
21. Kaprelyants, A., Kell, D. (1993) Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Resuscitation, *Applied and Environmental Microbiology,* **59**, 3187–3196.
22. Oliver, J.D. (2005) The Viable but Nonculturable State in Bacteria, *The Journal of Microbiology*, **43**, 93–100.
23. Barer, M.R. (1997) Viable but nonculturable and dormant bacteria: time to resolve an oxymoron and a misnomer?, *Journal of Medical Microbiology*, **46**, 629–631.
24. Barer, M.R., Harwood, C.R. (1999) Bacterial viability and culturability, *Advances in Microbial Physiology,* **41**, 93–137.
25. Barer, M.R., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., Kell, D. B. (1998) Microbial stress and culturability: conceptual and operational domains, *Microbiology*, **144**, 2009–2010.
26. Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R., Barer, M.R. (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: A review and discussion of the practical issues, *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 169–187.
27. Nyström, T. (2003) Conditional senescence in bacteria: death of the immortals, *Molecular Microbiology*, **48**, 17–23.
28. Kolter, R., Siegele, D.A., Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle, *Annual Review of Microbiology*, **47**, 855–874.
29. Hengge-Aronis, R. (2002) Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the sigmaS (RpoS) Subunit of RNA Polymerase, *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* **66**, 373–395.
30. Farewell, A., Kvint, K., Nyström, T. (1998) Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition, *Molecular Microbiology*, **29**, 1039–1051.
31. Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M., Nyström, T. (2000) Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 5746–5749.
32. Nyström, T. (2001) Not quite dead enough: On bacterial life, culturability, senescence, and death, *Archives of Microbiology,* **176**, 159–164.
33. Nyström, T. (2003) Nonculturable bacteria: Programmed survival forms or cells at death's door?, *BioEssays*, **25**, 204–211.
34. Dukan, S., Nyström, T. (1999) Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells, *Journal of Biological Chemistry,* **274**, 26027–26032.
35. Gerdes, K., Gultyaev, A.P., Franch, T., Mikkelsen, N.D. (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death, *Annual Review of Genetics,* **3**, 1–31.

36. Gerdes, K., Christensen, S.K., Løbner-Olesen, A. (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci, *Nature Reviews Microbiology,* **3**, 371–382.
37. Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal «addiction module» regulated by 3′,5′-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **93**, 6059–6063.
38. Pedersen, K., Christensen, S.K., Gerdes, K. (2002) Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins, *Molecular Microbiology,* **45**, 501–510.
39. Currás, M., Magariños, B., Toranzo, A. E., Romalde, J. L. (2002) Dormancy as a survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment, *Diseases of Aquatic Organisms,* **52**, 129–136.
40. Mukamolova, G., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M. (2003) Adoption of the transiently non-culturable state - a bacterial survival strategy?, *Advances in microbial physiology*, **47**, 65–129.
41. Roszak, D.B., Colwell, R.R. (1987) Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment, *Microbiological reviews*, **51**, 365–379.
42. Roszak, D.B., Colwell, R.R. (1987) Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count, *Applied and Environmental Microbiology,* **53**, 2889–2893.
43. Gunasekera, T.S., Sørensen, A., Attfield, P.V., Sørensen, S.J., Duncan, A. V. (2002) Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization, *Applied and Environmental Microbiology,* **68**, 1988–1993.
44. Oliver, J.D., Dagher, M., Linden, K. (2005) Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater, *Journal of Water and Health,* **3**, 249–257.
45. Aulet, O., Silva, C., Fraga, S.G., Pichel, M., Cangemi, R., Gaudioso, C., Porcel, N., Jure, M.A., De Castillo, M.C., Binsztein, N. (2007) Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* **40**, 385–390.
46. Солохина Л.В., Пушкарева В.И., Литвин В.Ю. (2001) Образование покоящихся форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием сине-зеленых водорослей (цианобактерий) и их экзометаболитов, *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии,* **3**, 17–22.
47. Романова Ю.М., Чегаева Е.В., Гинцбург А.Л. (1998) Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса, *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология,* **3,** 3–8.
48. Николеишвили Л.Р., Подосинникова Л.С. (2004) Переход холерных вибрионов в некультивируемое состояние под влиянием некоторых абиотических факторов, *Фундаментальные исследования*, **2**, 18–21.
49. Lee, D.G., Park, S.J., Kim, S.J. (2007) Influence of pipe materials and VBNC cells on culturable bacteria in a chlorinated drinking water model system, *Journal of microbiology and biotechnology,* **17**, 1558–1562.
50. Tholozan, J.L., Cappelier, J.M., Tissier, J.P., Delattre, G., Federighi, M. (1999) Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1110–1116.

51. Heidelberg, J.F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., Colwell, R.R. (1997) Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria, *Applied and Environmental Microbiology,* **63**, 3585–3588.
52. Bode, G., Mauch, F., Malfertheiner, P. (1993) The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability, *Epidemiology and Infection*, **111**, 483–490.
53. Cellini, L., Marzio, L., Allocati, N., Dainelli, B., Lezzi, T., Angelucci, D., Campli, E.D. (1994) Coccoid *Helicobacter pylori* Not Culturable In Vitro Reverts in Mice, *Microbiology and immunology*, **38**, 843–850.
54. Ganesan, B., Stuart, M.R., Weimer, B.C. (2007) Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*, *Applied and Environmental Microbiology,* **73**, 2498–2512.
55. Porter, J., Edwards, C., Pickup, R.W. (1995) Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes, *Journal of Applied Bacteriology,* **79**, 399–408.
56. Smith, B., Oliver, J.D. (2006) *In Situ* and *In Vitro* Gene Expression by *Vibrio vulnificus* during Entry into, Persistence within, and Resuscitation from the Viable but Nonculturable State, *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 1445–1451.
57. Saux, M.F., Hervio-heath, D., Loaec, S., Colwell, R.R., Pommepuy, M. (2002) Detection of Cytotoxin-Hemolysin mRNA in Nonculturable Populations of Environmental and Clinical *Vibrio vulnificus* Strains in Artificial Seawater, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5641–5646.
58. Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M.A.R., Colwell, R.R. (1996) Potential Virulence of Viable but Nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 115–120.
59. Signoretto, C., Lleò, M.D.M., Canepari, P. (2002) Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state, *Current microbiology*, **44**, 125–131.
60. Maalej, S., Gdoura, R., Dukan, S., Hammami, A., Bouain, A. (2004) Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature, *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 557–565.
61. Vora, G.J., Meador, C.E., Bird, M.M., Bopp, Ch.A., Andreadis, J.D., Stenger, D.A. (2005) Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio spp*., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 19109–19114.
62. Haque, M.M., Khan, S.I., Ahsan, C.R. (1970) Influence of Some Physicochemical Stresses on the Survival of *Vibrio cholerae* O1 at Non-Culturable State, *Bangladesh Journal of Microbiology*, **24**, 133–136.
63. Medlar, E.M., Bernstein, S., Steward, D.M. (1952) A bacteriologic study of resected tuberculous lesions, *American review of tuberculosis*, **66**, 36–43.
64. Beck, F., Yegian, D. (1952) A study of the tubercle bacillus in resected pulmonary lesions, *American review of tuberculosis*, **66**, 44–51.
65. Khomenko, A., Golyshevskaya, V. (1984) Filtrable forms of mycobacteria tuberculosis, *Zeitschrift für Erkrankungen der Atmungsorgane*, **162**, 147–154.
66. Biketov, S., Mukamolova, G.V., Potapov, V., Gilenkov, E., Vostroknutova, G., Kell, D.B., Young, M., Kapre-

lyants, A.S. (2000) Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: A bacterial growth factor promotes recovery, *FEMS immunology and medical microbiology*, **29**, 233–240.

67. Dhillon, J., Lowrie, D.B., Mitchison, D.A. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* from chronic murine infections that grows in liquid but not on solid medium, *BMC Infectious Diseases*, **4**, 4–7.
68. McCune, R.M., Feldmann, F.M., Lambert, H.P., McDermott, W. (1966) Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues, *Journal of Experimental Medicine*, **123**, 445–468.
69. McCune, R.M., McDermott, W., Tompsett, R. (1956) The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug, *Journal of Experimental Medicine*, **104**, 763–802.
70. de Wit, D., Wootton, M., Mitchison, D.A. (1995) The bacterial DNA content of mouse organs in the Cornell model of dormant tuberculosis, *Tubercle and Lung Disease*, **76**, 555–562.
71. Lillebaek, T., Dirksen, A., Baess, I., Strunge, B., Thomsen, V.Ø., Andersen, Å.B. (2002) Molecular Evidence of Endogenous Reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 Years of Latent Infection, *The Journal of Infectious Diseases*, **185**, 401–404.
72. Ehlers, S. (2009) Lazy, Dynamic or Minimally Recrudescent? On the Elusive Nature and Location of the Mycobacterium Responsible for Latent Tuberculosis, *Infection*, **37**, 87–95.
73. Salgame, P., Geadas, C., Collins, L., Jones-l, E., Ellner, J.J. (2015) Latent tuberculosis infection - Revisiting and revising concepts, *Tuberculosis*, **95**, 373–384.
74. Sia, I.G., Wieland, M.L. (2011) Current Concepts in the Management of Tuberculosis, *Mayo Clinic proceedings*, **86**, 348–361.
75. Opie, E. (1927) Tubercle bacilli in latent tuberculous lesions and in lung tissue without tuberculous lesions, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **4**, 1–21.
76. Lillebaek, T., Dirksen, A., Vynnycky, E., Baess, I., Thomsen, V.O., Andersen, Å.B. (2003) Stability of DNA Patterns and Evidence of *Mycobacterium tuberculosis* Reactivation Occurring Decades after the Initial Infection, *The Journal of Infectious Diseases*, **188**, 1032–1039.
77. Wallis, R.S., Patil, Sh., Cheon, S., Edmonds, K.A.Y., Phillips, M., Perkins, M.D., Joloba, M., Namale, A., Johnson, J.L., Teixeira, L., Dietze, R., Siddiqi, S., Mugerwa, R., Eisenach, K., Ellner, J.J. (1999) Drug Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**, 2600–2606.
78. Hirsch, C., Ellner, J.J., Russell, D.G., Rich, E.A. (1994) Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor–alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages, *Journal of Immunology*, **152**, 743–753.
79. Russell, D.G. (2007) Who puts the tubercle in tuberculosis?, *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 39–47.
80. Saunders, B.M., Britton, W.J. (2007) Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis, *Immunology & Cell Biology*, **85**, 103–111.
81. Via, L.E., Lin, P.L., Ray, S.M., Carrillo, J., Allen, S.S., Eum, S.Y., Tay-

lor, K., Klein, E., Manjunatha, U., Gonzales, J., Lee, E.G., Park, S.K., Raleigh, J.A., Cho, S.N., Mcmurray, D.N., Flynn, J.L., Clifton, E. Barry III (2008) Tuberculous Granulomas Are Hypoxic in Guinea Pigs, Rabbits, and Nonhuman Primates, *Infection and Immunity*, **76**, 2333–2340.

82. Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P.D., Nathan, C., Schoolnik, G.K. (2003) Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment, *Journal of Experimental Medicine*, **198**, 693–704.
83. Бухарин О.В. (2008) Персистенция бактериальных патогенов как физиологический феномен, *Вестник Московского университета*, **16**, 6–13.
84. Bigger, J.W. (1944) Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin By Intermittent Sterilisation, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **244**, 497–500.
85. McDermott, W. (1969) Microbial persistence, *Harvey Lectures*, **63**, 1–31.
86. Lewis, K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease, *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 48–56.
87. Rieger, M., Mauch, H., Hakenbeck, R. (2017) Long Persistence of a *Streptococcus pneumoniae* 23F Clone in a Cystic Fibrosis Patient, *mSphere*, **2**, 1–11.
88. Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S. (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch, *Science*, **305**, 1622–1625.
89. Yogeswari, L., Chacko, C.W. (1971) Persistence of *T. pallidum* and its significance in penicillin-treated seropositive late syphilis, *The British journal of venereal diseases*, **47**, 339–347.
90. Wood, D.N., Chaussee, M.A., Chaussee, M.S., Buttaro, B.A. (2005) Persistence of *Streptococcus pyogenes* in stationary-phase cultures, *Journal of Bacteriology*, **187**, 3319–3328.
91. Tuomanen, E. (1986) Phenotypic tolerance: the search for 3-lactam antibiotics that kill nongrowing bacteria, *Reviews of Infectious Diseases*, **8**, 279–291.
92. Ford, C., Lin, P.L., Chase, M.R., Shah, R., Iartchouk, O., Galagan, J., Mohaideen, N., Ioerger, T.R., Sacchettini, J.C., Lipsitch, M., Flynn, J.L., Fortune, S.M. (2011) Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection, *Nature Genetics*, **43**, 482–486.
93. Colangeli, R., Arcus, V.L., Cursons, R.T., Ruthe, A., Karalus, N., Coley, K., Manning, Shannon, D., Kim, S., Marchiano, E., Alland, D. (2014) Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* reveals slow growth and low mutation rates during latent infections in humans, *PLoS One*, **9**, e91024.
94. Zhang, Y., Amzel, L. (2005) Tuberculosis Drug Targets, *Current Drug Targets*, **3**, 131–154.
95. Zhang, Y. (2004) Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis, *Frontiers in Bioscience*, **9**, 1136–1156.
96. Loebel, R.O., Shorr, E., Richardson, H.B. (1933) The influence of foodstuffs upon the respiratory metabolism and growth of human tubercle bacilli, *Journal of Bacteriology*, **26**, 139–166.
97. Salina, E.G., Waddell, S.J., Hoffmann, N., Rosenkrands, I., Butcher, P.D., Kaprelyants, A.S. (2014) Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states, *Open Biology*, **4**, 140106.

98. Betts, J.C, Lukey, P.T., Robb, L.C., Mcadam, R.A., Duncan, K. (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling, *Molecular Microbiology*, **43**, 717–731.

99. Hobby, G.L., Lenert, T.F. (1957) The *in vitro* action of antituberculous agents against multiplying and non-multiplying microbial cells, *American review of tuberculosis*, **76**, 1031–1048.

100. Deb, C., Lee, C., Dubey, V.S., Daniel, J., Abomoelak, B., Tatiana, D., Pawar, S., Rogers, L., Kolattukudy, P.E. (2009) A Novel In Vitro Multiple-Stress Dormancy Model for *Mycobacterium tuberculosis* Generates a Lipid-Loaded , Drug-Tolerant, Dormant Pathogen, *PLoS One*, **4**, e6077.

101. Wayne, L., Sohaskey, C. (2001) Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Annual Review of Microbiology*, **55**, 139–163.

102. Welin, A., Raffetseder, J., Eklund, D., Stendahl, O., Lerm, M. (2011) Importance of phagosomal functionality for growth restriction of *Mycobacterium tuberculosis* in primary human macrophages, *Journal of Innate Immunity*, **3**, 508–518.

103. Kudykina, Y.K., Shleeva, M.O., Artsabanov, V.Yu., Suzina, N.E.., Kaprelyants, A.S. (2011) Generation of dormant forms by *Mycobacterium smegmatis* in the poststationary phase during gradual acidification of the medium, *Mikrobiologiia*, **80**, 638–649.

104. Eruslanov, E.B., Majorov, K.B., Orlova, M.O., Mischenko, V.V., Kondratieva, T.K., Apt, A.S., Lyadova, I.V. (2004) Lung cell responses to *M. tuberculosis* in genetically susceptible and resistant mice following intratracheal challenge, *Clinical and Experimental Immunology*, **135**, 19–28.

105. Shleeva, M., Kondratieva, T., Rubakova, E., Vostroknutova, G., Kaprelyants, A., Apt, A. (2015) Reactivation of dormant «non-culturable» *Mycobacterium tuberculosis* developed invitro after injection in mice: Both the dormancy depth and host genetics influence the outcome, *Microbial Pathogenesis*, **78**, 63–66.

106. Kondratieva, T., Shleeva, M., Kapina, M., Rubakova, E., Linge, I., Dyatlov, A., Kondratieva, E., Kaprelyants, A., Apt, A. (2020) Prolonged infection triggered by dormant *Mycobacterium tuberculosis*: Immune and inflammatory responses in lungs of genetically susceptible and resistant mice, *PLoS One*, **15**, e0239668.

107. Trutneva, K.A., Shleeva, M.O., Demina, G.R., Vostroknutova, G.N., Kaprelyans, A.S. (2020) One-Year Old Dormant, «Non-culturable» *Mycobacterium tuberculosis* Preserves Significantly Diverse Protein Profile, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 26.

108. Shleeva, M.O., Kondratieva, T.K., Demina, G.R., Rubakova, E.I., Goncharenko, A.V., Apt, A.S., Kaprelyants, A.S. (2017) Overexpression of Adenylyl Cyclase Encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2212 Gene Confers Improved Fitness, Accelerated Recovery from Dormancy and Enhanced Virulence in Mice, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**, 370.

109. Trutneva, K., Shleeva, M., Nikitushkin, V., Demina, G., Kaprelyants, A. (2018) Protein composition of *Mycobacterium smegmatis* differs significantly between active cells and dormant cells with ovoid morphology, *Frontiers in Microbiology*, **9**, 2083.

110. Nikitushkin, V.D., Trenkamp, S., Demina, G.R., Shleeva, M.O., Kaprelyants, A.S. (2020) Metabo-

lic profiling of dormant *Mycolicibacterium smegmatis* cells' reactivation reveals a gradual assembly of metabolic processes, *Metabolomics*, **16**, 1–14.

111. Shleeva, M.O., Trutneva, K.A., Demina, G.R., Zinin, A.I., Sorokoumova, G.M., Laptinskaya, P.K., Shumkova, E.S., Kaprelyants, A.S. (2017) Free Trehalose Accumulation in Dormant *Mycobacterium smegmatis* Cells and Its Breakdown in Early Resuscitation Phase, *Frontiers in Microbiology*, **8**, 524.
112. Nikitushkin, V.D., Shleeva, M.O., Zinin, A.I., Trutneva, K.A.., Ostrovsky, D.N., Kaprelyants, A.S. (2016) The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin, *FEMS Microbiology Letters*, **363**, 1–8.
113. Fuhrhop, J. (1974) The reactivity of the porphyrin ligand, *Angewandte Chemie International Edition,* **13**, 321–335.
114. Antonova, N.A., Osipova, V.P., Kolyada, M.N., Movchan, N.O., Milaeva, E.R., Pimenov, Yu.T. (2010) Study of the antioxidant properties of porphyrins and their complexes with metals, *Macroheterocycles*, **3**, 139–144.
115. Castello, P., Drechsel, D.A, Day, B.J., Patel, M. (2008) Inhibition of mitochondrial hydrogen peroxide production by lipophilic metalloporphyrins, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **324**, 970–976.
116. Patel, M., Day, B.J. (1999) Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants, *Trends in Pharmacological Sciences*, **20**, 359–364.
117. Albrethsen, J., Agner, J., Piersma, S.R., Højrup, P., Pham, T., Weldingh, K., Jimenez, C.R., Andersen, P., Rosenkrands, I. (2013) Proteomic Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin–antitoxin systems, *Molecular & Cellular Proteomics,***12**, 1180–1191.
118. Ang, K., Ibrahim, P., Gam, L. (2014) Analysis of differentially expressed proteins in late-stationary growth phase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Biotechnology and Applied Biochemistry,* **61**, 153–164.
119. Kim, S.Y., Lee, B., Shin, S.J., Kim, H., Park, J. (2008) Differentially expressed genes in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under mild acidic and hypoxic conditions, *Journal of Medical Microbiology*, **57**, 1473–1480.
120. Schubert, O.T., Ludwig, C., Kogadeeva, M., Zimmermann, M., Rosenberger, G., Gengenbacher, M., Gillet, L.C., Collins, B.C., Röst, H.L., Kaufmann, S.H., Sauer, U., Aebersold, R. (2015) Absolute proteome composition and dynamics during dormancy and resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Cell Host Microbe*, **18**, 1–13.
121. Salina, E.G., Mollenkopf, H.J., Kaufmann, S.H.E., Kaprelyants, A.S. (2009) *M. tuberculosis* gene expression during transition to the «nonculturable» state, *Acta Naturae*, **1**, 73–77.
122. Zimmermann, M., Kuehne, A., Boshoff, H.I., Barry, C.E., Zamboni, N., Sauer, U. (2015) Dynamic exometabolome analysis reveals active metabolic pathways in non-replicating mycobacteria, *Environmental Microbiology*, **17**, 4802–4815.
123. Rosenkrands, I., Slayden, R.A., Crawford, J., Aagaard, C., Barry, C.E. 3rd, Andersen, P. (2002) Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome ana-

lysis of cellular and extracellular proteins, *Journal of Bacteriology*, **184**, 3485–3491.

124. Starck, J., Källenius, G., Marklund, B.I., Andersson, D.I., Åkerlund, T. (2004) Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions, *Microbiology*, **150**, 3821–3829.
125. Dayaram, Y.K., Talaue, M.T., Connell, N.D., Venketaraman, V. (2006) Characterization of a glutathione metabolic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* and its resistance to glutathione and nitrosoglutathione, *Journal of Bacteriology*, **188**, 1364–1372.
126. Fiehn, O. (2002) Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes, *Plant Molecular Biology*, **48**, 155–171.
127. Pethe, K., Sequeira, P.C., Agarwalla, S., Rhee, K., Kuhen, K., Phong, W.Y., Patel, V., Beer, D., Walker, J.R., Duraiswamy, J., Jiricek, J., Keller, T.H., Chatterjee, A., Tan, M.P., Ujjini, M., Rao, S.P., Camacho, L., Bifani, P., Mak, P.A., Ma, I., Barnes, S.W., Chen, Z., Plouffe, D., Thayalan, P., Ng, S.H., Au, M., Lee, B.H., Tan, B.H., Ravindran, S., Nanjundappa, M., Lin, X., Goh, A., Lakshminarayana, S.B., Shoen, C., Cynamon, M., Kreiswirth, B., Dartois, V., Peters, E.C., Glynne, R., Brenner, S., Dick, T. (2010) A chemical genetic screen in *Mycobacterium tuberculosis* identifies carbon-source-dependent growth inhibitors devoid of *in vivo* efficacy, *Nature Communications*, **1**, 57.
128. Lo, T.W.C., Westwood, M.E., McLellan, A.C., Selwood, T., Thornalley, P.J. (1994) Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological Conditions, *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 32299–32305.
129. Billig, S., Schneefeld, M., Huber, C., Grassl, G.A., Eisenreich, W., Bange, F.C. (2017) Lactate oxidation facilitates growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages, *Scientific Reports*, **7**, 1–12.
130. Wood, J.M. (2006) Osmosensing by bacteria, *Science's STKE: signal transduction knowledge environment,* **2006**, pe43.
131. Wood, J.M. (2007) Bacterial Osmosensing Transporters, *Methods in Enzymology*, **428,** 77–107.
132. Kempf, B., Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments, *Archives of Microbiology*, **170**, 319–330.
133. Horlacher, R., Uhland, K., Klein, W., Ehrmann, M., Boos, W. (1996) Characterization of a cytoplasmictrehalase of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **178**, 6250–6257.
134. Shleeva, M.O., Savitsky, A.P., Nikitushkin, V.D., Soloviev, I.D., Trutneva, K.A., Keruchenko, Ya.S., Kaprelyants, A.S. (2020) Effect of Photodynamic Inactivation against Dormant Forms and Active Growing Cells of *Mycobacterium smegmatis*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **56**, 242–249.
135. Argüelles, J.C. (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: A comparative analysis, *Archives of Microbiology*, **174**, 217–224.
136. Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. (2003) New insights on trehalose: A multifunctional molecule, *Glycobiology*, **13**, 17R–27R.
137. Shleeva, M.O., Savitsky, A.P., Nikitushkin, V.D., Solovyev, I.D., Ka-

zachkina, N.I., Perevarov, V.V., Kaprelyants, A.S. (2019) Photoinactivation of dormant *Mycobacterium smegmatis* due to its endogenous porphyrins, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 9687–9695.