

О.Ю. Манзенюк*, В.В. Фирстова, Т.Н. Мухина, И.Г. Шемякин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
п. Оболенск, Российская Федерация

Молекулярные системы регулирования формирования биопленок бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

В настоящее время внутрибольничные инфекции, обусловленные бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, продолжают оставаться актуальной проблемой ввиду устойчивости этого микроорганизма к широкому спектру антибактериальных препаратов и способности формировать биопленки, которые в 1000 раз менее чувствительны к воздействию антибиотиков, нежели свободноживущие (планктонные) культуры. Формирование биопленок *P. aeruginosa* регулируется коммуникационной системой «чувство кворума» (quorum sensing, QS), которая находится под контролем ингибиторов системы (QSIs). Важную роль в формировании биопленок играет внеклеточная ДНК (eDNA), структурный полианионный полимер, что само по себе является уникальным свойством, поскольку роль генетического носителя информации в данном случае не применима. Формирование биопленок *P. aeruginosa* регулируется также внутренними сигнальными молекулами *c-di-GMP* и каскадом киназ *Gac/Rsm*. В обзоре дано описание молекулярных механизмов действия ингибиторов сигнальных молекул системы QS, а также соединений, модулирующих сигналы QS.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, биопленки, сигналы «чувство кворума», ингибиторы системы «чувство кворума».

(Для цитирования: Манзенюк О.Ю., Фирстова В.В., Мухина Т.Н., Шемякин И.Г. Молекулярные системы регулирования формирования биопленок бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2018;73(4):244–251. doi: 10.15690/vramn1010)

244

Проблема множественной лекарственной устойчивости, факторы патогенности и персистенции бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

Возбудитель синегнойной инфекции бактерии *Pseudomonas aeruginosa* впервые был обнаружен в 1862 г. [1]. В 1882 г. синегнойная палочка (*Bacillus pyocyaneus*) была выделена в «чистой» культуре [2, 3]. Последующие 130 лет ознаменовались интенсивным развитием микробиологии, эпидемиологии и медицинских наук, однако на сегодняшний день ситуация с лечением инфекций, обусловленных *P. aeruginosa*, усугубилась с появлением штаммов с множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам: в ряде случаев эту внутрибольничную инфекцию невозможно лечить с помощью современных антибиотиков из-за устойчивости бактерии к этим препаратам [4]. Так, например, в США в 2013 г. в абсолютных цифрах зарегистрирована 51 000 госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, из которых 13% случаев были обусловлены мультирезистентными штаммами, а летальность от инфекции составила 440 случаев за год [5].

Возможной причиной недооценки клинической значимости этой инфекции, на наш взгляд, могла служить

теоретическая предпосылка, которая главенствовала до 1970-х годов прошлого века. Тогда считалось, что бактерии и в частности псевдомонады живут в окружающей среде в виде одиночных организмов (планктонный образ жизни). Однако позднее было показано, что иные формы жизни бактерий широко распространены там, где присутствуют антибиотики и факторы иммунной защиты. Начиная с 90-х годов прошлого века основное внимание исследователей было сфокусировано на изучении механизмов выживания патогенных микроорганизмов во внешней среде в виде монобинарных/мультивидовых биопленок и феномена множественной лекарственной устойчивости к широкому спектру антибактериальных препаратов [6, 7].

P. aeruginosa — грамтрицательный факультативный (оппортунистический) патоген человека, редко являющийся причиной инфекционных заболеваний у здоровых людей, однако часто ассоциированный с нозокомиальными (внутрибольничными) инфекциями: в 16% случаев вызывает легочные инфекции, в 12% — инфекции мочевыводящих путей, в 8% — хирургические раневые и ожоговые инфекции, в 10% — генерализованные инфекции крови [8].

O.Yu. Manzenyuk*, V.V. Firstova, T.N. Mukhina, I.G. Shemyakin

FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Molecular Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms

Nowadays healthcare-associated infections caused *Pseudomonas aeruginosa* remain actual problem due to *P. aeruginosa* resistance to a wide range of antimicrobials and its ability to form biofilms that are 1000 times more resistant to antibiotics than free-living (plankton) cultures. *P. aeruginosa* biofilms forming is regulated by Quorum Sensing (QS) communication system which is controlled by inhibitors (Quorum sensing inhibitors, QSIs). An essential role in stabilization of biofilms belongs to extracellular DNA (eDNA) as a structural polyanionic polymer whereas its genetic function is not applicable. In addition, internal signal molecules *c-di-GMP*, cascade *Gac/Rsm* also participate in formation of *P. aeruginosa* biofilms. A review provides a detailed description of the biofilm molecular regulation by means of QS inhibitors and QS modulators of signaling molecules QS.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms, Quorum Sensing (QS) signals, Quorum Sensing inhibitors (QSIs).

(For citation: Manzenyuk OYu, Firstova VV, Mukhina TN, Shemyakin IG. Molecular Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2018;73(4):244–251. doi: 10.15690/vramn1010)

Возбудитель псевдомоноза занимает первое место в структуре гнойно-септических инфекций в родовспомогательных учреждениях Российской Федерации. Так, например, ретроспективный анализ медицинских карт новорожденных детей в 2015 г. в одном из регионов РФ, нацеленный на поиск клинических форм гнойно-септических инфекций, показал превышение показателей заболеваемости более чем 3 раза по сравнению с официальными статистическими показателями. В акушерских стационарах эти показатели, по данным ретроспективного анализа документации, превышали официальную статистику более чем в 4 раза [9].

Высокая лекарственная устойчивость псевдомонад обусловлена R-плазмидами — кольцевыми двуспиральными внехромосомными ДНК, передающимися от штамма к штамму путем конъюгации, трансформации или трансдукции. R-плазмиды могут нести 10 и более маркеров резистентности. Такая возможность обмена генетической информацией об антибиотикоустойчивости внутри вида и рода способствует появлению полирезистентных штаммов. *P. aeruginosa* обладает природной чувствительностью к β -лактамам антибиотикам (цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему), аминогликозидам и фторхинолонам, которые обычно являются эффективными при терапии псевдомонозов. Особую опасность представляет резистентность синегнойной палочки к карбапенемам — меропенему и имипенему, которые наряду с другими антисинегнойными средствами являются препаратами выбора в терапии тяжелых инфекций, вызванных *P. aeruginosa*. Мутации, обуславливающие блокирование поступления антибиотика в клетку, являются основным механизмом резистентности к карбапенемам. Ферментная инактивация обычно реализуется с помощью бета-лактамаз, принадлежащих к молекулярным классам A (GES, KPC), D (OXA-50), а также металло-бета-лактамазы класса B (VIM, IMP). Для *P. aeruginosa* описано пять основных групп металло-бета-лактамаз: они содержат по два атома цинка и отличаются друг от друга аминокислотными последовательностями [10, 11].

Факторы патогенности *P. aeruginosa* обусловлены секретруемыми веществами, связанными с клеткой, или веществами, секретруемыми экстрацеллюлярно, — адгезинами, экзотоксинами S и A, липополисахаридами. Наиболее важную роль в патогенности *P. aeruginosa* играет экзотоксин A — экстрацеллюлярный белок, который продуцируют более 90% клинических штаммов псевдомонад. Механизм функционирования экзотоксина подобен механизму функционирования дифтерийного токсина и основан на блокаде синтеза белка. Экзотоксин A *P. aeruginosa* обуславливает гибель лабораторных животных при парентеральном введении через 48 ч. Патологоморфологическое изучение печени животных через 4 ч после введения экзотоксина A показывало частичный некроз клеток. Полный некроз клеток наблюдался спустя двое суток после введения очищенного препарата экзотоксина A [12].

В работе Р. Gilbert и А. McVain были идентифицированы гены *P. aeruginosa*, ответственные за синтез факторов патогенности: ферменты эластазы, кодируемая геном *lasB*; протеаза, кодируемая *lasA*; экзотоксин A, кодируемый *toxA*; щелочная фосфатаза, кодируемая геном *aprA* [13]. Кроме того, сюда входит белковый комплекс RhlR с аутоиндуктором C4-HSL, который индуцирует экспрессию генов вирулентности *lasB* и *aprA* [13, 14].

Бактерии *P. aeruginosa* могут образовывать несколько типов биопленок. Бактерии, дефектные по признаку

ауторегуляции, формируют на границе твердой и жидкой фаз биопленку, представляющую собой слой клеток без морфологической дифференциации, т.е. присутствуют только внутренняя и наружная части [15]. Показано, что микробные клетки передвигаются по поверхности раздела сред [16], затем теряют подвижность. Некоторые из них слипаются друг с другом и начинают выделять внеклеточные полимеры (липополисахариды, гликопротеины, полисахариды, экстрацеллюлярную (внеклеточную) ДНК (extracellular DNA, eDNA), которые называют внеклеточными полимерными субстанциями (extracellular polymeric substances, EPS) [17]. Они в свою очередь формируют внеклеточный полимерный матрикс. В результате деления клеток возникают компактные микроколонии, объединенные матриксом. При неблагоприятных условиях наступает стадия деградации, и часть клеток гибнет, высвобождаясь в окружающую среду в виде планктонных свободноплавающих *P. aeruginosa* [18]. Характерной особенностью *P. aeruginosa* являются бинарные биопленки, в которых бактерии сохраняют жизнеспособность и высокую численность совместно с быстрорастущей культурой *Klebsiella pneumoniae* [19, 20].

Таким образом, «биопленочная конструкция» представляет собой микроколонию, окруженные внеклеточным полимерным матриксом из внеклеточных полимерных субстанций. Внеклеточный полимерный матрикс может деградировать под влиянием бактерий матрикса на полисахариды, белки и eDNA [21, 22].

Молекулярные механизмы регулирования формирования биопленок *Pseudomonas aeruginosa*

Первая аргументированная концепция ингибирования коммуникационной клеточной системы «чувство кворума» (quorum sensing, QS) была изложена в работе М. Hentzer и соавт. [23]. В ее основе лежал принцип антибактериального лечения псевдомонозов бромированными фуранонами. Впервые лечение инфекции не влияло на активность возбудителя инфекции *in vivo*. Этот феномен послужил основанием для последующих исследований ингибиторов клеточной системы QS (quorum sensing inhibitors, QSIs), которые в перспективе могли бы быть использованы в «антибиопленочной» терапии.

Идея воздействия на биопленку и факторы патогенности без учета гибели возбудителя инфекции приобрела большую популярность при разработке противомикробной стратегии и в свою очередь повлекла за собой исследования малых соединений QSIs, способных ингибировать клеточные регуляторные системы QS, — внутренние сигнальные молекулы (internal signal molecule c-di-GMP), некодирующие регуляторные малые РНК RsmY и RsmZ (RNAs RsmY, RNAs RsmZ), каскад киназ Gac/Rsm (табл. 1) [24, 25].

Ингибирующее действие микробных полисахаридов на формирование биопленок

При изучении влияния микробных полисахаридов на рост бактерий было обнаружено явление конкуренции между биопленками различных бактерий. Другими словами, полисахариды, входящие в состав внеклеточного полимерного матрикса биопленок одного микроорганизма, могут ингибировать формирование биопленок

Таблица 1. Межклеточные регуляторные системы, участвующие в жизненном цикле биопленки *P. aeruginosa*

Система «чувство кворума», QS	Внутренние сигнальные дигуанозинмонофосфаты, c-di-GMP	РНК Gac/Rsm каскад
Экстрацеллюлярная ДНК	Экзополисахариды	Экзополисахариды
Рамнолипид	Адгезины	Подвижность
Пиоцианин	Подвижность	Система AHL: N-ацил-L-гомосерин лактон
-	Дисперсия с высвобождением бактерий	-

другими бактериями. Так, например, было показано, что капсульные полисахариды группы II уropатогенного штамма *Escherichia coli* подавляли формирование биопленок *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae* [26].

Экзополисахариды обеспечивают структурную стабильность при формировании биопленок за счет продукции альгинатов Psl (polysaccharide synthesis locus) и Pel (от pellicule; полисахарид с высоким содержанием глюкозы). В обычных условиях окружающей среды альгинаты не продуцируются. Накопление экзополисахаридов Pel и Psl обусловлено влиянием каскада киназ Gac/Rsm [27]. Таким образом, внеклеточный полисахарид способствует формированию биопленки с помощью уникальной схемы регулирования положительной обратной связи, которая может играть роль при отборе планктонных бактерий для присоединения к существующей биопленке.

Защита от макроорганизма: внеклеточная (экстрацеллюлярная) ДНК

Продукция eDNA, контролируемая QS [18], обеспечивает как структурную устойчивость биопленки, так и увеличение антимикробной устойчивости. Более того, было показано, что eDNA является фактором, способствующим, в частности, блокированию дыхательных путей больных муковисцидозом (кистозный фиброз; cystic fibrosis) вследствие секреции мокроты с высокой вязкостью. У таких больных содержание eDNA составляло 3–14 мг/мл по сравнению с контрольной группой, у которой eDNA отсутствовала. ДНК — высокоанионный полимер; считается, что ее роль в увеличении антибиотикоустойчивости осуществляется за счет связывания положительно заряженных антибиотиков, таких как аминогликозиды, и антимикробных пептидов. Также было показано, что большие количества ДНК обладали катион-хелатирующим свойством, вызывающим клеточный лизис, который в свою очередь приводил к высвобождению клеточного содержимого, включая внутриклеточную ДНК [28]. eDNA, внедряемая в биопленку, может поступать из лизированных клеток иммунной системы организма-хозяина. Последние исследования подтверждают факт экзогенного продуцирования eDNA как основного фактора микробной защиты [29]. Заслуживает внимания тот факт, что лизис полиморфноядерных лейкоцитов (polymorphonuclear leukocytes, PMNs) приводил к ускорению образования биопленки за счет высвобождения ДНК PMNs, которая затем функционировала как eDNA. Это означает, что если «биопленочная» инфекция не устраняется иммунной системой, то последующее включение eDNA, высвобождаемой из PMNs в матрице биопленки, способствует дальнейшему повышению структурной стабильности «биопленочной» колонии, а также увеличению устойчивости по отношению к положительно заряженным антибиотикам [30].

Феназины и рамнолипиды

Феназины — это группа молекул пигментов, продуцируемых *Pseudomonas spp.* Многие из феназинов оказывают токсическое действие в отношении клеток прокариот и эукариот. Наиболее изученным из них является пиоцианин (pyocyanin), который присутствует исключительно у бактерий *P. aeruginosa*. Продукция пиоцианина регулируется сигнальной системой PQS (*Pseudomonas* quinolone signal). Пиоцианин считается одним из основных факторов патогенности *P. aeruginosa* при острых и хронических инфекциях: он повреждает эпителиальные клетки, подавляет пролиферацию лимфоцитов и инактивирует ингибитор протеазы альфа, что приводит к повреждению тканей из-за повышенного уровня эндогенных протеаз. Помимо этого, пиоцианин ингибирует продукцию простациклина легочными эндотелиальными клетками и ограничивает рост Т-лимфоцитов вследствие высвобождения интерлейкина 2. Прямое связывание пиоцианина с парами азотистых оснований ДНК влияет на гидрофобность клеточной поверхности и таким образом на агрегацию клеток, повышающих структурную стабильность биопленки [31].

Другим считающимся ключевым QS-регулируемым фактором патогенности являются рамнолипиды (rhamnolipids) — рамнозосодержащий гликолипидный биосурфактант. Бактерии *P. aeruginosa* продуцируют два основных класса рамнолипидов — моно- и дирамнолипиды, которые кодируются тремя генами на двух разных оперонах. Один оперон несет гены *rhlAB* (*rhlA*, *PA3479*) и *rhlB* (*rhlB*, *PA3478*), другой — *rhlC* (*PA1131*). Оперон *rhlAB* кодирует фермент рамносилтрансферазу (rhamnosyltransferase), который принимает участие в синтезе монорамнолипида (mono-rhamnolipid), а *rhlC* кодирует вторую рамносилтрансферазу, которая преобразует монорамнолипид в дирамнолипид.

Рамнолипид является термостабильным гемолизинем с множеством свойств: он ускоряет лизис нейтрофилов, макрофагов клеток животных; принимает участие в обеспечении ротационной подвижности клеток; влияет на формирование биопленок; обладает антимикробной активностью в отношении различных бактерий, таких как *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* (минимальная ингибирующая концентрация в диапазоне от 0,5 до 32 мкг/мл), а также в отношении грибов *Penicillium funiculosum* и *Fusarium solani* (минимальная ингибирующая концентрация 16 и 75 мкг/мл соответственно) [32].

Уничтожая PMNs, бактерия защищается от иммунной системы «хозяина», тем самым увеличивая собственный потенциал выживания. Эта функция была названа «щитом рамнолипидов» (rhamnolipid shield). Так, например, было продемонстрировано увеличение содержания рамнолипида в биопленке под воздействием PMNs. Предполагается, что биопленка *P. aeruginosa* может реагировать

на присутствие PMNs путем установки рамнолипидного «щита» [33]. Продукция рамнолипида и пиоцианина находится под контролем интегрированной системы QS (integrated QS system), которая идентифицирована J. Lee и соавт. как новый класс сигнальной QS *P. aeruginosa* [33]. Также было показано, что система IQS контролируется геном *las* при нормальных условиях роста. В условиях ограничения фосфатов система IQS берет на себя функции *las*-системы и активирует систему PQS [34]. Поскольку мутации в генах *lasI* или *lasR* часто обнаруживались в клинических изолятах *P. aeruginosa* [35], было высказано предположение, что система IQS может функционировать как альтернативный сигнальный механизм поддержания экспрессии генов вирулентности *P. aeruginosa* при хронических формах инфекции.

Сигнальные молекулы — нуклеотиды c-di-GMP

Нуклеотиды c-di-GMP играют важную роль внутриклеточных вторичных сигнальных молекул при переключении сигналов между режимом роста и подвижностью компонентов биопленки. Молекулы c-di-GMP являются положительным регулятором продукции нескольких адгезинов *P. aeruginosa* (табл. 2). Переключение сигналов зависит от внутриклеточной концентрации c-di-GMP. Низкие уровни c-di-GMP благоприятствуют экспрессии факторов, обуславливающих подвижность клеток, а высокие уровни, напротив, способствуют «сидячему стилю жизни» биопленки (sessile lifestyle) за счет увеличения экспрессии факторов адгезии и фрагментов внеклеточного матрикса [36]. Количество молекул c-di-GMP находится в зависимости от двух ферментов:

- дигуанилатциклаза (diguanylate cyclase, DGC) синтезирует c-di-GMP из двух молекул гуанозинтрифосфата (guanosine triphosphate, GTP);
- фосфодиэстераза (phosphodiesterase, PDE) расщепляет c-di-GMP до линейного динуклеотида pGpG.

В настоящее время определено более 100 белков, такие как WspR, DGC, BifA, участвующих в хемотаксисе с помощью жгутиков [37]. Однако специфическая функция c-di-GMP-связывающих белков до сих пор неизвестна. Так, например, синтез пилей IV типа регулируется

Таблица 2. Основные компоненты, находящиеся под контролем C-di-GMP и GAC систем

C-di-GMP	Gac-система: RetS, GacS, LadS
Белки PilZ, FimX (пили IV типа)	Малая РНК RsmZ
Белки WspR, MогA (фимбрии)	Малая РНК RsmY
Белок CdrA поверхностный	Сигнальная молекула C4-HSL (AHL-компонент)
Белок Alg 44	Сигнальная молекула 3-оксо-C12HSL (LasR-компонент)
Полисахарид Psl	Система секреции III типа
Фенотип «мелкие колонии» (RSCV)	Система секреции VI типа

ется c-di-GMP и зависит от белков PilZ и FimX, которые в свою очередь имеют c-di-GMP-связывающие домены. Было обнаружено, что экспрессия гена *cupA* фимбрий зависит от белков WspR, MогA и PA1120. Показано, что PDE RocR участвует в синтезе CupB и CupC фимбрий. При этом экспрессия поверхностного белка CdrA, который связывает клетки *P. aeruginosa* с полисахаридом Psl, положительно контролируется c-di-GMP на транскрипционном уровне. Повышенные концентрации c-di-GMP приводят к увеличению продукции Psl и других компонентов матрицы биопленки [38].

Синтез альгината также положительно регулируется c-di-GMP. Мембранозаякоренный белок Alg44, который является частью альгинатсинтазы, содержит c-di-GMP-связывающий домен PilZ. Стимуляция активности Alg44 через домен PilZ, по-видимому, происходит путем связывания c-di-GMP с мембранозаякоренным белком MucR. Некоторые данные указывают на то, что нуклеотиды c-di-GMP участвуют в изменении инфекционного процесса в сторону хронического состояния. Мукоидный фенотип при хронических инфекциях в определенной степени регулируется c-di-GMP. Более того, изоляты *P. aeruginosa* кистозного фиброза, которые проявляют фенотип диссоциантов мелких колоний (rough small colony variant, RSCV), имеют повышенные уровни экспрессии генов *pel* и *psl*. Было высказано предположение, что данный фенотип RSCV может способствовать увеличению уровней лекарственной устойчивости при инфекции дыхательных путей [39].

Gac-система

В проксимальной части генома перед AHL и PQS системами, которые можно назвать центральными частями системы QS, находится система трансдукции Gac. Gac-система состоит из трансмембранной киназы GacS, которая аутофосфорилирует консервативный гистидиновый остаток, затем этот фосфат переносится на собственный регулятор GacA. Последний влияет на транскрипцию двух малых РНК (sRNAs) — RsmZ и RsmY. Эти две sRNAs связываются с CsrA — гомологом RsmA, посттранскрипционным регуляторным белком, который подавляет различные гены-мишени, ответственные за подвижность бактерий. RsmA оказывает отрицательное влияние на синтез сигнальных молекул — компонентов факторов патогенности C4-HSL и 3-оксо-C12-HSL. RsmY и RsmZ оказывают противоположное действие, что приводит к увеличению продукции факторов патогенности.

В дополнение к GacS были идентифицированы две другие сенсорные киназы для регулирования экспрессии гена через GacA: RetS — регулятор экзополисахарида и секреции III типа и LadS (lost adherence sensor). В работе A. Goodman и соавт. [40] было показано, что эффект достигается за счет образования гетеродимеров между RetS и GacS, что в свою очередь приводит к блокированию аутофосфорилирования GacS и служит указанием на то, что RetS является антагонистом GacS. Функция LadS имеет противоположную направленность: он активирует экспрессию RsmY и RsmZ через GacA [41, 42]. Эти и другие данные *in vitro* позволяют сделать вывод, что острые инфекции обычно связаны с высоким уровнем вирулентности и секреции, обусловленной системой секреции III типа (type III secretion system, T3SS), тогда как хронические инфекции, вероятнее всего, связаны с режимом биопленки, когда вирулентность бактерий

низкая в силу экспрессии системы VI типа (type VI secretion system, T6SS) [43].

Взаимосвязи между регулируемыми системами

Недавние исследования позволили установить, что каскад Gac/Rsm регулирует гены, кодирующие поглощение железа, и тем самым продукцию сидерофора посредством модуляции внутриклеточного уровня c-di-GMP. Активированная система Gac, как правило, связана со снижением вирулентности и экспрессии системы T6SS за счет непосредственного взаимодействия между каскадом Gac/Rsm и системой c-di-GMP. Так, например, в работе I. Vente была показана связь между c-di-GMP и RetS-путями и переключение с системы T3SS на T6SS [44]. Более того, экспрессию T3SS и T6SS можно переключать с помощью изменения количества c-di-GMP в присутствии функциональных RsmY и RsmZ. Позднее эта исследовательская группа обнаружила взаимосвязь между системами, показав, что DGC SadC (surface attachment defective) супрессируется RsmA [44, 45].

происходят из аллиина (alliin) в результате ферментативного процесса, возникающего при измельчении чеснока и/или нагревании. Соединение аджоен представляет собой смесь двух изомеров — E и Z. Недавно было показано, что мишенью аджоен является Gac/Rsm — часть системы QS, угнетающей экспрессию двух малых регуляторных РНК — RsmY и RsmZ [53], тем самым устраняющей изолирующее влияние малых РНК на RsmA. Кроме того, результаты демонстрировали уменьшение экспрессии системы секреции VI (T6SS), что указывает на свойство соединения аджоен обуславливать переключение в направлении острого инфекционного состояния.

Скрининг 69 других различных источников натурального сырья показал, что высоким уровнем ингибирующей QSI-активности в отношении *P. aeruginosa* обладал экстракт хрена иберин [54]. Это стало очевидным при лечении иберином мышей, которое, однако, не показало значительного снижения микробной обсемененности на внутрибрюшинной модели мышей. Транскриптомный анализ бактерий, подвергшихся воздействию иберина и азитромицина, демонстрирует существенные различия в количестве генов, регулируемых этими двумя соединениями. Азитромицин в концентрации 2 мкг/мл обуславливает снижение экспрессии 227 генов, 82 из которых являются QS-регулируемыми, в то время как иберин снижает экспрессию 41 гена [55].

248

Соединения, модулирующие сигналы QS

В одной из работ M. Hentzer и соавт. [46] на примере химически модифицированных галогенированных фуранонов были представлены доказательства концепции ингибирования QS по типу антимикробного действия. Работы по исследованию химически модифицированных фуранонов продолжают в направлении создания менее токсических небромированных фуранонов [47].

Данные о кристаллической структуре белка LasR позволили разработать рациональный дизайн для виртуального скрининга структур новых модуляторов QS [48], таких как, например, салициловая кислота, нифуроказид и хлорзоксазон. При высокопроизводительном скрининге 200 000 малых соединений были найдены два наиболее активных QSI — ингибитора LasR, которые содержали 12-углеродный алкильный «хвост» и таким образом напоминали 3-оксо-C12-HSL. Первое соединение, обозначенное PD12, имело ингибирующую концентрацию IC50 равную 30 нМ. Второе соединение, обозначенное V-06-018, имело ингибирующую концентрацию IC50 10 мкМ. Оба соединения ингибировали продукцию эластазы и пиоцианина [49, 50]. В работе T. Rasmussen был проведен скрининг различных природных источников: показано, что экстракт чеснока (*Allium sativum*) обладал выраженным ингибирующим действием на QS-систему бактерий *P. aeruginosa*. Сначала на модели хронической инфекции нематод было доказано, что экстракт *Allium sativum* снижал смертность нематод до 5% и, кроме того, повышал восприимчивость биопленки *P. aeruginosa* при лечении тобрамицином [51]. Также была показана ускоренная элиминация *P. aeruginosa* на «легочной модели» мыши при обработке экстрактом *Allium sativum* [52]. Оказалось, что он содержит ряд активных соединений QSI, многие из которых теряются при фракционировании и очистке. Основным активным соединением-ингибитором (QSI) было идентифицировано сероорганическое соединение в виде бесцветной жидкости, содержащее сульфоксидные и дисульфидные функциональные группы — аджоен (ajoene). Соединение состоит из двух молекул аллицина, которые

Малые РНК (sRNAs) — «кандидаты» регулирования механизма формирования биопленки

Кандидатом регулирования формирования биопленки являются посттранскрипционные регуляторы — малые РНК. В настоящее время в литературе описано более 200 небольших РНК в геноме *P. aeruginosa*; однако об их биологических функциях в клетке известно мало. Так, малая РНК, обозначенная как SrбA локус, повышала уровень экспрессии SrбA в 45 раз в культурах биопленки штамма *P. aeruginosa* PA14. Потеря экспрессии SrбA в делеционном штамме приводила к 66%-му уменьшению массы биопленки. При этом потеря экспрессии SrбA не оказывала влияния на устойчивость к антибиотикам ципрофлоксацину, гентамицину и тобрамицину. По-видимому, малая РНК SrбA важна для образования биопленки *P. aeruginosa* [56, 57].

Соединения, модулирующие c-di-GMP сигналы

Эбселен (ebselen) — синтетическое селеноорганическое соединение, которое модифицирует остатки цистеина и, кроме того, обладает противовоспалительной и антиоксидантной активностью. Недавнее исследование показало, что эбселен ингибирует связывание c-di-GMP с DGC и белком WspR в низких концентрациях (мкМ), влияет на c-di-GMP фенотип, обеспечивающий дисперсию клеток и уменьшение образования биопленки [58].

Бензотиазолинон — пример идентификации специфического ингибитора c-di-GMP, регулирующего степень вирулентности *P. aeruginosa*. Соединение было получено недавно в результате высокопроизводительного скрининга 250 000 соединений. Последующий тест *in silico* показал, что он, однако, не влиял на формирование биопленки, хотя и ингибировал PDE RocR *P. aeruginosa* [59].

Заключение

Приведенные в обзоре данные заболеваемости и смертности, обусловленные бактериями *P. aeruginosa*, свидетельствуют о серьезности проблемы, связанной с лечением послеоперационных осложнений у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии с высоким риском внутрибольничного инфицирования резистентными штаммами *P. aeruginosa*, формирующими биопленки. Данные о том, насколько распространена в России устойчивость к отдельным антибиотикам, практически отсутствуют. В создавшейся в настоящее время ситуации чрезвычайно важной является разработка адекватных методов лечения, применимых в условиях отделений реанимации и интенсивной терапии, а также сдерживающих мер по ограничению распространения возбудителя синегнойной инфекции.

На примере описания молекулярных механизмов резистентности *P. aeruginosa* и формирования «биопленочного» фенотипа нами сделана попытка анализа возможных подходов к регулированию формирования биопленок *P. aeruginosa* в микробных сообществах.

Отличительным свойством бактерий *P. aeruginosa* является широкий набор факторов патогенности — белковых молекул (адгезинов, гемолизинов, экзотоксинов, протеаз), липополисахаридов и др. Наличие плазмид, несущих множественные маркеры устойчивости к антибактериальным препаратам, придают клеткам *P. aeruginosa* уникальную способность чрезвычайно быстрой модификации генома и преодоления защитных механизмов организма-хозяина.

Доказано, что патогенные псевдомонады, обитающие в биопленках, широко распространены в среде, где присутствуют антибиотики и другие факторы антимикробной защиты. Изучение механизмов формирования защитных форм выживания патогенных микроорганизмов во внешней среде в виде монобинерных-мультивидовых биопленок позволили установить основные (но далеко не все) структурные и функциональные элементы биопленок.

Показано, что «биопленочная структура» состоит из микроколоний, которые окружены внеклеточным полимерным матриксом, состоящим из EPS, которые деградируют под влиянием бактерий матрикса на полисахариды, белки, жиры, eDNA.

В последнее время значительное число работ посвящено исследованию путей ингибирования компонентов биопленки *P. aeruginosa* без уничтожения возбудителя

инфекции. Это направление включает в себя исследования ингибиторов системы QS, способных подавлять активность клеточной регуляторной системы QS. Прежде всего, это внутренние сигнальные молекулы c-di-GMP, некодирующие регуляторные малые РНК RsmY и RsmZ, каскад киназ Gac/Rsm. Открытие ингибиторов клеточной системы QS инициировало исследования на транскрипционном уровне регуляторов клеточной системы QS и других мишеней-кандидатов, которые могли бы быть использованы в перспективе в медицине.

Вместе с тем следует отметить, что изучение различных химических соединений с ингибирующей активностью при высокопроизводительном скрининге не дает точных данных о нежелательных побочных эффектах активного соединения. Вследствие этого эксперименты *in vivo* на лабораторных животных остаются важным звеном в процессе отбора кандидатов лекарств, эффективных в отношении полирезистентных штаммов *P. aeruginosa*.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Выражение признательности

Авторы выражают признательность В.К. Плакунову и М.В. Журиной за весьма полезные замечания при обсуждении экспериментальных и теоретических аспектов формирования биопленок у различных видов бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

- Arivett BA, Ream DC, Fiester SE, et al. Draft genome sequences of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from wounded military personnel. *Genome Announc.* 2016;4(4):e00829-16. doi: 10.1128/genomeA.00829-16.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2000;2(9):1051–1060. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01259-4.
- Bergey DH, Holt JG. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
- World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development. *An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*. Geneva: World Health Organization; 2017.
- cdc.gov [Internet]. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Report. pp. 69–71. [cited 2018 Aug 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322–332. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):551–560. doi: 10.3201/eid0404.980405.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- Захарова Ю.А. Гнойно-септическая заболеваемость новорожденных при различных формах эпидемиологического наблюдения (выборочные исследования). // *Медицинский алфавит*. — 2015. — Т.1. — №6 — С. 15–18. [Zakharova YuA. Gnoino-septicheskaya zaboлеваemost' novorozhdennykh pri razlichnykh formakh epidemiologicheskogo nablyudeniya

- (vyborochnye issledovaniya). *Meditsinskii alfavit*. 2015;1(6):15–18. (In Russ.)]
10. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю., Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. Изучение действия субингибирующих концентраций антибиотиков на экспрессию генов, регулирующих продукцию факторов патогенности у бактерий комплекса Burkholderia cepacia и Pseudomonas aeruginosa. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. — 2005. — №2 — С. 13–16. [Shaginyan IA, Chernukha MY, Zigangirova NA. Izuchenie deistviya subingibiruyushchikh koncentraciy antibiotikov na expressiyu genov, reguliruyushchikh produkciyu faktorov patogenosti u bakteriy kompleksa Burkholderia cepacia i Pseudomonas aeruginosa. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2005;(2):13–16. (In Russ.)]
 11. Jacoby GA. Properties of an R plasmid in Pseudomonas aeruginosa producing amikacin (BB-K8), butirosin, kanamycin, tobramycin, and sisomicin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1974;6(6):807–810. doi: 10.1128/aac.6.6.807.
 12. Дзюбак С.Т. Механизм действия экзотоксина Pseudomonas aeruginosa на макроорганизм (экспериментальные исследования) // *Журнал микробиологии*. — 1984. — №3 — С. 35–39. [Dzyubak ST. Mekhanizm deistviya ekzotoksina Pseudomonas aeruginosa na makroorganizm (eksperimental'nye issledovaniya). *Zhurnal mikrobiologii*. 1984;(30):35–39. (In Russ.)]
 13. Gilbert P, McBain A. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(2):189–208. doi: 10.1128/CMR.16.2.189-208.2003.
 14. Duan K, Surette MG. Environmental regulation of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J Bacteriol*. 2007;189(13):4827–4836. doi: 10.1128/JB.00043-07.
 15. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280(5361):295–298. doi: 10.1126/science.280.5361.295.
 16. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Mol Microbiol*. 1998;30(2):295–304. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.
 17. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005;13(1):20–26. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.006.
 18. Webb JS, Thompson LS, James S, et al. Cell death in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *J Bacteriol*. 2003;185(15):4585–4592. doi: 10.1128/jb.185.15.4585-4592.2003.
 19. Плакунов В.К., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты. // *Микробиология*. — 2017. — Т.86. — №4 — С. 402–420. [Plakunov VK, Mart'yanov SV, Teteneva NA, Zhurina MV. Controlling of microbial biofilms formation: anti- and probiofilm agents. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2017;86(4):402–420. (In Russ.)] doi: 10.7868/s0026365617040127.
 20. Banks MK, Bryers JD. Bacterial species dominance within binary culture biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57(7):1974–1979.
 21. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. *Mol Microbiol*. 2006;59(4):1114–1128. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x.
 22. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Environ Microbiol*. 2008;10(9):2331–2343. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x.
 23. Hentzer M, Eberl L, Givskov M. Transcriptome analysis of Pseudomonas aeruginosa biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofilms*. 2005;2(1):37–61. doi: 10.1017/s1479050505001699.
 24. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J*. 2003;22(15):3803–3815. doi: 10.1093/emboj/cdg366.
 25. Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(9):4457–4464. doi: 10.1128/aem.68.9.4457-4464.2002.
 26. Bernal P, Llamas MA. Promising biotechnological applications of antibiofilm polysaccharides. *Microb Biotechnol*. 2012;5(6):670–673. doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00359.x.
 27. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, et al. The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol*. 2012;14(8):1913–1928. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x.
 28. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, et al. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(23):9188–9192. doi: 10.1073/pnas.87.23.9188.
 29. Chiang WC, Nilsson M, Jensen PØ, et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2352–2361. doi: 10.1128/AAC.00001-13.
 30. Das T, Kutty SK, Tavallaie R, et al. Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for Pseudomonas aeruginosa biofilm. *Sci Rep*. 2015;5:8398. doi: 10.1038/srep08398.
 31. Habu E, Pinazo A, Jauregui O, et al. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng*. 2003;81(3):316–322. doi: 10.1002/bit.10474.
 32. Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen PØ, et al. Pseudomonas aeruginosa recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology*. 2009;155(Pt 11):3500–3508. doi: 10.1099/mic.0.031443-0.
 33. Lee J, Wu J, Deng Y, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol*. 2013;9(5):339–343. doi: 10.1038/nchembio.1225.
 34. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Jakobsen TH, et al. Quorum sensing and virulence of Pseudomonas aeruginosa during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2010;5(4):e10115. doi: 10.1371/journal.pone.0010115.
 35. Christen M, Christen B, Folcher M, et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem*. 2005;280(35):30829–30837. doi: 10.1074/jbc.M504429200.
 36. Düvel J, Bertinetti D, Möller S, et al. A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in Pseudomonas aeruginosa. *J Microbiol Methods*. 2012;88(2):229–236. doi: 10.1016/j.mimet.2011.11.015.
 37. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, et al. Pseudomonas aeruginosa uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol*. 2010;75(4):827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.
 38. Oglesby LL, Jain S, Ohman DE. Membrane topology and roles of Pseudomonas aeruginosa Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology*. 2008;154(Pt 6):1605–1615. doi: 10.1099/mic.0.2007/015305-0.
 39. Kay E, Humair B, Dénevaud V, et al. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*. 2006;188(16):6026–6033. doi: 10.1128/JB.00409-06.
 40. Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, et al. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev*. 2009;23(2):249–259. doi: 10.1101/gad.1739009.
 41. Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, et al. The hybrid histidine kinase LadS forms a multicomponent signal transduction

- system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*. 2016;12(5):e1006032. doi: 10.1371/journal.pgen.1006032.
42. Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*. 2006;312(5779):1526–1530. doi: 10.1126/science.1128393.
 43. Frangipani E, Visaggio D, Heeb S, et al. The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*. 2014;16(3):676–688. doi: 10.1111/1462-2920.12164.
 44. Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, et al. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):171–176. doi: 10.1073/pnas.0507407103.
 45. Moscoso JA, Jaeger T, Valentini M, et al. The diguanylate cyclase SadC is a central player in Gac/Rsm-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2014;196(23):4081–4088. doi: 10.1128/JB.01850-14.
 46. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. 2002;148(Pt 1):87–102. doi: 10.1099/00221287-148-1-87.
 47. Read R, Kumar N. Production of Furanones. United States patent 20070032666 A1. 2007 Feb 8.
 48. Zou Y, Nair SK. Molecular basis for the recognition of structurally distinct autoinducer mimics by the *Pseudomonas aeruginosa* LasR quorum-sensing signaling receptor. *Chem Biol*. 2009;16(9):961–970. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.09.001.
 49. Yang L, Rybtke MT, Jakobsen TH, et al. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2432–2443. doi: 10.1128/AAC.01283-08.
 50. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol*. 2005;187(5):1799–1814. doi: 10.1128/jb.187.5.1799-1814.2005.
 51. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, et al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*. 2005;151(Pt 12):3873–3880. doi: 10.1099/mic.0.27955-0.
 52. Pratt DA. Garlic and other alliums. The lore and the science. By Eric Block. *Angew Chem Int Ed*. 2010;49(40):7162. doi: 10.1002/anie.201004351.
 53. Jakobsen TH, Warming AN, Vejborg RM, et al. A broad range quorum sensing inhibitor working through sRNA inhibition. *Sci Rep*. 2017;7(1):9857. doi: 10.1038/s41598-017-09886-8.
 54. Jakobsen TH, Bragason SK, Phipps RK, et al. Food as a source for quorum sensing inhibitors: Iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(7):2410–2421. doi: 10.1128/AEM.05992-11.
 55. Tan SY, Liu Y, Chua SL, et al. Comparative systems biology analysis to study the mode of action of the isothiocyanate compound iberin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(11):6648–6659. doi: 10.1128/AAC.02620-13.
 56. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3648–3663. doi: 10.1128/AAC.01230-07.
 57. Taylor PK, Van Kessel ATM, Colavita A, et al. A novel small RNA is important for biofilm formation and pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182582. doi: 10.1371/journal.pone.0182582.
 58. Lieberman OJ, Orr MW, Wang Y, Lee VT. High-throughput screening using the differential radial capillary action of ligand assay identifies ebselen as an inhibitor of diguanylate cyclases. *ACS Chem Biol*. 2014;9(1):183–192. doi: 10.1021/cb400485k.
 59. Zheng Y, Tsuji G, Opoku-Temeng C, Sintim HO. Inhibition of *P. aeruginosa* c-di-GMP phosphodiesterase RocR and swarming motility by a benzothiazolinone derivative. *Chem Sci*. 2016;7(9):6238–6244. doi: 10.1039/c6sc02103d.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

*Манзенок Оксана Юрьевна, к.м.н. [Oksana Y. Manzenyuk, MD, PhD];

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск [address: Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russia], e-mail: macebarron2013@gmail.com, SPIN-код: 6871-5381, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8641-8517>

Фирстова Виктория Валерьевна, д.б.н. [Victoria V. Firstova, PhD]; e-mail: firstova@obolensk.org, SPIN-код: 9166-9151, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9898-9894>

Мухина Татьяна Николаевна, к.б.н. [Tatiana N. Mukhina, PhD]; e-mail: cecile98@rambler.ru, SPIN-код: 6858-5052, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5829-0512>

Шемякин Игорь Георгиевич, д.б.н., профессор [Igor G. Shemyakin, PhD, Professor]; e-mail: shemyakin@obolensk.org, SPIN-код: 3180-1459, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9667-1674>