

УДК 579.22

Н. М. Кашеварова<sup>a</sup>, А. Г. Ткаченко<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>b</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

## ПОЛИАМИНЫ ПОВЫШАЮТ ТОЛЕРАНТНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* К НЕТИЛМИЦИНУ

Изучено влияние полиаминов на толерантность *E. coli* к аминогликозидному антибиотику нетилмицину. В периодических культурах полиаминпрофицитных штаммов *E. coli* по мере увеличения плотности культуры и перехода ее в стационарную фазу наблюдалось увеличение числа персистерных клеток, толерантных к нетилмицину. На полиаминдефицитном мутанте показано, что в контрольной культуре на протяжении всего периода культивирования число персистеров варьировало в пределах одного порядка. Однако добавка в среду полиаминов вызывала концентрационно-зависимое возрастание числа толерантных клеток при переходе в стационарную фазу роста. Эффективность действия полиаминов на частоту персистообразования снижалась в ряду: спермидин → путресцин → кадаверин. Установлена пороговая концентрация нетилмицина, приводящая к полной гибели всех клеток, в то время как при более низких концентрациях антибиотика наблюдалась двухфазная модель отмирания, при которой после 5-часовой обработки погибали все чувствительные клетки, и оставалась фракция толерантных клеток. Одновременная добавка путресцина в зависимости от концентрации аминогликозида либо полностью снимала отрицательное действие антибиотика, либо приводила к снижению числа жизнеспособных клеток на 1–1.5 порядка. Эффективность действия путресцина на выживаемость клеток зависит от времени его внесения в культуру с момента добавки антибиотика.

**Ключевые слова:** нетилмицин; полиамины; толерантные клетки; персистообразование; полиаминзависимый мутант.

N. M. Kashevarova<sup>a</sup>, A. G. Tkachenko<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State University, Perm, Russian Federation

## POLYAMINES INCREASE *ESCHERICHIA COLI* TOLERANCE TO NETILMICIN

Polyamine effect on *E. coli* tolerance to aminoglycoside netilmicin was studied. In batch cultures of *E. coli* polyamine-proficient strains the number of persister cells tolerant to netilmicin was increased with increasing the cell density upon transition from exponential growth to stationary phase. In the control un-supplemented culture of polyamine-deficient *E. coli* strain the number of persister cells fluctuated over the same range throughout the cultivation. However, polyamine supplementation resulted in a concentration-dependent increase in the number of tolerant cells as the culture entered the stationary phase. Efficiency of polyamine action decreased in the following order: spermidine → putrescine → cadaverine. The threshold concentration of netilmicin leading to killing of all cells was determined as 1.0 µg/ml. The cultures treated with lower concentrations of the antibiotic displayed biphasic time-killing curves when sensitive cells were killed and subpopulations of tolerant cells survived after 5 hour exposure to netilmicin. When cells were treated by various concentrations of netilmicin, putrescine supplementation produced either full elimination of negative drug effect or 10-50-fold decrease in the number of viable cells depending on aminoglycoside concentration. Putrescine effect we have shown to be maximal when it was added to cells before the drug challenge.

**Key words:** netilmicin; polyamines; tolerant cells; persister formation; polyamine-deficient strain.

Поиск и синтез новых антибактериальных препаратов неизбежно сопровождается совершенствованием адаптивных механизмов микроорганизмов с целью выживания в условиях действия новых стрессовых факторов. Это приводит к тому, что ус-

тойчивость бактерий к антибиотикам продолжает расти и является серьезной угрозой здоровью человечества. В связи с этим понимание механизмов бактериальной устойчивости к действию антибиотиков является необходимым условием для даль-

нейшей разработки новых, более эффективных способов борьбы с патогенными бактериями.

Нетилмицин – полусинтетический антибиотик широкого спектра действия, относящийся к группе аминогликозидов – бактерицидных антибиотиков, мишенью которых является 30S-субъединица бактериальной рибосомы. Антибактериальное действие аминогликозидов обусловлено тем, что они: 1) ингибируют белковый синтез; 2) приводят к синтезу нефункциональных белков, нарушая правильность считывания генетического кода и повышая количество ошибок при трансляции; 3) в больших концентрациях снижают барьерные функции клеточных мембран [Jana, Deb, 2006]; 4) вызывают окислительный стресс в результате стимуляции образования гидроксильных радикалов [Kohanski et al., 2007].

В формировании резистентности к аминогликозидам выделяют следующие механизмы: 1) ферментативная инактивация аминогликозидов путем присоединения к молекуле антибиотика остатка уксусной кислоты, фосфорной кислоты или аденина, что приводит к потере его способности связываться с рибосомами и подавлять биосинтез белка; 2) снижение их концентрации внутри клетки в результате изменения проницаемости наружной мембраны, сниженного транспорта через внутреннюю мембрану, активного выброса из клетки; 3) модификации мишени антибиотика – мутационные (16S рРНК и рибосомальных белков) или химическая (в результате метилирования сайта связывания антибиотика (молекулы 16S рРНК) в специфических позициях с использованием ферментов метилаз и метилтрансфераз) [Jana, Deb, 2006; Shakil et al., 2008].

Помимо вышеперечисленных механизмов антибиотикорезистентности, которые функционируют, когда клетки находятся в активном состоянии,

существует альтернативная стратегия выживания. При ее реализации бактерии избегают летального действия антибиотиков, находясь в состоянии, которое характеризуется замедлением скорости роста и метаболических функций [Gefen, Balaban, 2009; Dörr, Vulić, Lewis, 2010]. Лишь относительно небольшая часть клеток популяции способна «персистировать» (выживать) в условиях пролонгированного действия летальных концентраций антибиотика благодаря тому, что мишень антибиотика находится в неактивном состоянии, недоступном для его повреждающего воздействия. Такие медленно растущие или нерастущие (дормантные) клетки – персисторы – генетически идентичны остальной чувствительной к антибиотикам части популяции, но проявляют фенотипическую толерантность к антибиотикам [Lewis, 2010]. Количество персисторов в популяции определяется фазой роста периодической культуры.

В настоящее время в литературе имеется много данных о вовлеченности полиаминов (путресцина, кадаверина, спермидина) в разнообразные клеточные процессы. Эти биогенные поликатионы участвуют в формировании адаптации бактериальных клеток к различным стрессовым факторам посредством регуляции транспортных процессов, улавливания свободных радикалов, компактизации ДНК, регуляции экспрессии глобальных транскрипционных регуляторов и адаптивных генов [Tabor, Tabor, 1985; Igarashi, Kashiwagi, 2006]. Целью данной работы является исследование роли полиаминов в повышении толерантности бактерий *Escherichia coli* к аминогликозиду нетилмицину.

## Материалы и методы исследования

Использованные в работе штаммы *E. coli* приведены в таблице.

**Бактериальные штаммы, использованные в работе**

Штаммы <i>E. coli</i>	Генотип	Источник или ссылка
BW25141	F-, $\Delta(araD-araB)567$ , $\Delta lacZ4787(::rrmB-3)$ , $\Delta(phoB-phoR)580$ , $\lambda$ , $galU95$ , $\Delta uidA3::pir^+$ , $recA1$ , $endA9(\Delta del-ins)::FRT$ , $rph-1$ , $\Delta(rhaD-rhaB)568$ , $hsdR514$	Datsenko, Wanner, 2000
MC4100	F-, $araD139$ , $\Delta(argF-lac)$ , U169, $deoC1$ , $rpsL150$ , $relA1$ , $flbB5301$ , $ptsF25$ , $rbsR$	Coli Genetic Stock Center (CGSC)
SHT03	F-, $thr-1$ , $araC14$ , $\Delta speD98$ , $\Delta(gpt-proA)62$ , $lacY1$ , $glnX44(AS)$ , $galK2(oc)$ , $\lambda$ , $\Delta(speB-speA)97$ , $\Delta(speC-glcB)63$ , $rpsL25(strR)$ , $xylA5$ , $mtl-1$ , $thiE1$ , $ampCp-1$ , $cadA2$ , $lacZ-\lambda DE3 \lambda RZ5rpoS742::lacZ[hybr$	Лабораторный музей
SHT03pSOPR	Как SHT03, но трансформирован плазмидой SOPR	Лабораторный музей

Штаммы *E. coli* культивировали на минеральной среде M-9, содержащей 0.4% глюкозы, в колбах объемом 250 мл в термостатируемом шейкере (37°C, 120 об/мин) или в 96-луночных иммунологических планшетах (Медполимер, Россия) в мультимодальном планшетном ридере «Тесан» (Швейцария). При работе с полиаминзависимыми штаммами *E. coli* SHT03 и SHT03pSOPR к среде M-9 добавляли 1 мкг/мл тиамин, 100 мкг/мл пролина

и 1 мкг/мл пантотената (Sigma, Germany). Нетилмицин (Верофарм, Россия) и полиамины путресцин, спермидин и кадаверин (Sigma, Switzerland) вносили в культуры в экспоненциальной фазе роста в концентрациях, указанных в подписях к рисункам.

В экспериментах по изучению влияния путресцина на выживаемость клеток *E. coli* BW25141 при обработке сублетальными концентрациями (СЛК)

антибиотика ночную культуру разводили в среде М-9 до  $OD_{600}=0.05$ , разливали в лунки планшета по 200 мкл и культивировали в мультимодальном планшетном ридере «Теспа» с периодическим встряхиванием. При  $OD_{600}=0.08-0.09$  вносили СЛК нетилмицина (0.8; 1.0; 1.4 мкг/мл). За 10 мин. до добавки антибиотика и спустя 20, 40 и 60 мин. в соответствующие лунки вносили 5 мМ путресцина. После 3 ч. воздействия антибиотика пробы разводили в растворе NaCl (0.9%) и делали высев на чашки с LB-агаром. Через 24 ч. подсчитывали выросшие колонии (КОЕ).

С целью изучения динамики персистообразования ночные культуры полиаминпрофицитных штаммов *E. coli* BW25141 и MC4100 разводили в свежей среде М-9 до  $OD_{600}=0.1$ . Пробы отбирали каждые 2 ч. в течение первых 8 ч., а далее с 24-часовыми интервалами для определения общего числа культивируемых клеток и персистеров, толерантных к 2.8 мкг/мл нетилмицина. Определение числа персистерных клеток осуществляли на основе протокола, представленного в статье [Keren et al., 2004]. Для этого пробы разводили в соотношении 1:1 в свежей среде М-9, содержащей антибиотик (2×). После 3-часовой обработки со встряхиванием пробы отмывали от антибиотика, делали разведения в физиологическом растворе и высевали по 10 мкл на чашки с LB-агаром. Через 24 ч. культивирования производили подсчет выросших клонов персистерных клеток. Частоту персистообразования определяли как отношение числа персистеров к общей численности культивируемых клеток на момент отбора образцов. Культуру полиаминдефицитного мутанта *E. coli* SHT03, предварительно истощенного на среде М-9, разводили в свежей среде М-9 и культивировали ночь (15–17 ч.) до экспоненциальной фазы роста. При  $OD_{600}=0.5$  вносили разные концентрации полиаминов и далее отбирали пробы каждые 2 ч., затем через 24 и 48 ч. с момента добавки полиаминов для определения общего числа культивируемых клеток и частоты персистообразования.

В серии экспериментов изучали влияние путресцина на выживаемость клеток полиаминзависимого штамма *E. coli* SHT03pSOPR, обработанных в течение 5, 24 и 48 ч. возрастающими концентрациями нетилмицина в диапазоне от субингибиторных до летальных (0.01; 0.1; 0.4; 1.0 мкг/мл), которые вносились в культуру в логарифмической фазе роста. С целью оценить содержание персистеров в культуре в момент добавки антибиотика и после 5-, 24- и 48-часовой обработки низкими концентрациями аминокликозида клетки далее подвергали дополнительному 3-часовому воздействию более высокой концентрации антибиотика (2.8 мкг/мл). Культуру полиаминдефицитного штамма *E. coli* SHT03pSOPR, предварительно истощенного на минеральной среде М-9, разводили в соотношении 1:250 в свежей среде М-9 и разливали по 200 мкл в лунки планшета, далее куль-

тивировали ночь в мультимодальном планшетном ридере «Теспа» с периодическим встряхиванием. 5 мМ путресцина и нетилмицин (0.01–1.0 мкг/мл) вносили при достижении экспоненциальной фазы роста ( $OD_{600}=0.06-0.07$ ). В образцах культуры, отобранных в момент внесения нетилмицина и спустя 5, 24 и 48 ч. действия антибиотика, определяли содержание клеток, выживших после обработки низкими концентрациями аминокликозида (жизнеспособных клеток), и персистеров, толерантных к 2.8 мкг/мл нетилмицина.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», 2001).

## Результаты и их обсуждение

В экспериментах со штаммом *E. coli* BW25141 в экспоненциальную культуру вносили сублетальные концентрации нетилмицина, а также 5 мМ путресцина в разное время с момента добавки антибиотика. Результаты проведенных нами исследований показали, что эффективность положительного действия путресцина на выживаемость клеток зависела от времени его внесения в культуру относительно добавки антибиотика (рис. 1). Внесение путресцина, предшествующее добавке антибиотика, наиболее эффективно снимало бактерицидный эффект. Однако положительное действие полиамина ослабевало пропорционально удлинению временного интервала его внесения после добавки нетилмицина.

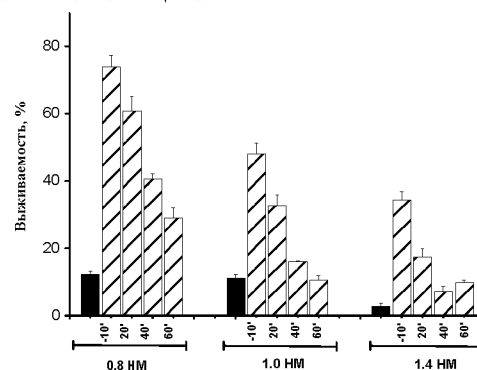


Рис. 1. Влияние путресцина на выживаемость *E. coli* BW25141 в зависимости от времени его внесения в культуру и концентрации нетилмицина.

Нетилмицин (НМ) вносили в сублетальных концентрациях (0.8; 1.0; 1.4 мкг/мл). Добавку 5 мМ путресцина делали за 10 мин. до, через 20, 40 и 60 мин. после внесения нетилмицина.

Черные столбцы – культуры без добавки путресцина, заштрихованные – культуры с добавкой путресцина

Изучение динамики численности бактерий, толерантных к 2.8 мкг/мл нетилмицина, в периодических культурах полиаминпрофицитных штаммов *E. coli* MC4100 и BW25141, растущих на синтети-

ческой среде М-9, выявило их низкое содержание в экспоненциальной фазе роста и дальнейшее возрастание их числа (на 4–5 порядков) по мере увеличения плотности культуры и перехода ее в стационарную фазу (рис. 2). Следует отметить штаммоспецифичность динамики перистообразования изученных полиаминпрофицитных штаммов.

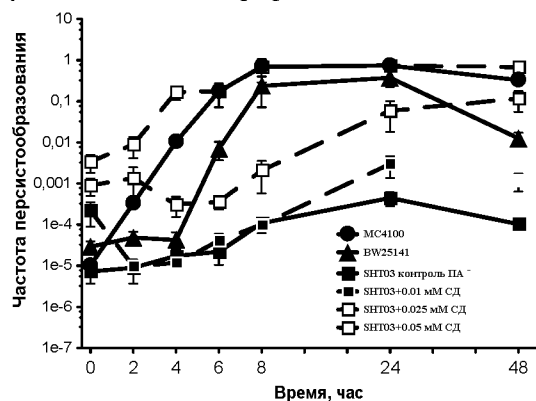


Рис. 2. Динамика перистообразования в периодических культурах разных штаммов *E. coli* на минеральной среде М-9.

Полиаминпрофицитные штаммы *E. coli* MC4100 и BW25141 культивировали без добавки полиаминов. Полиаминзависимый мутант SHT03 – контроль без полиаминов (ПА<sup>-</sup>) (сплошная линия) и с добавлением разных концентраций спермидина (0.01; 0.025; 0.05 мМ СД) (пунктирные линии)

В то же время в контрольной культуре полиаминдефицитного мутанта *E. coli* SHT03, не содержащей полиаминов, на протяжении всего периода культивирования число толерантных бактерий варьировало в пределах одного порядка. Однако добавка в среду культивирования разных концентраций спермидина (0.01; 0.025; 0.05; 0.1 мМ) вызывала концентрационно-зависимое возрастание числа толерантных клеток при переходе в стационарную фазу роста (рис. 2). При этом при концентрациях 0.05 и 0.1 мМ отмечался уже одинаковый эффект (рис. 3). Таким образом, максимальный эффект спермидина, который повышал частоту перисторных клеток полиаминзависимого штамма до уровня полиаминпрофицитных штаммов, проявлялся при концентрации 0.05 мМ.

Ранее нами было показано, что добавка путресцина в концентрациях 0.1; 1.0; 5.0 мМ в экспоненциальную культуру полиаминзависимого штамма на среде М-9 приводила к концентрационно-зависимому возрастанию числа клеток, толерантных к 2.8 мкг/мл нетилмицина, при переходе культуры в стационарную фазу роста [Tkachenko et al., 2014]. Путресцин в концентрациях 1.0 и 5.0 мМ проявлял одинаковый по силе эффект на динамику частоты персистенции в культуре *E. coli* SHT03, которая соответствовала этому показателю в полиаминпрофицитном штамме MC4100. Следова-

но, эффективность действия путресцина на частоту персистенции примерно в 20 раз ниже таковой спермидина. Также нами были проведены исследования по влиянию кадаверина на частоту перистообразования, однако его эффект был значительно ниже такового для спермидина и путресцина и проявлялся только в стационарной фазе. Таким образом, эффективность действия полиаминов на частоту персистенции снижалась в ряду: спермидин → путресцин → кадаверин (рис. 3).

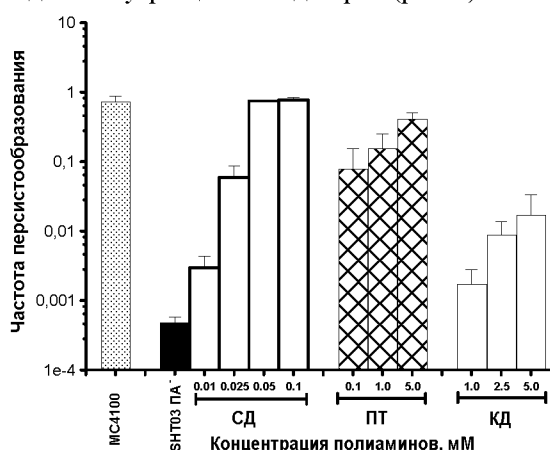


Рис. 3. Влияние разных концентраций полиаминов на частоту перистообразования в культуре полиаминдефицитного штамма *E. coli* SHT03 на синтетической среде М-9 спустя 24 ч. после внесения полиаминов.

Черный столбец – контрольная культура SHT03 без полиаминов (ПА<sup>-</sup>); светлые столбцы – с добавкой спермидина СД (0.01; 0.025; 0.05; 0.1 мМ); заштрихованные – путресцина ПТ (0.1; 1.0; 5.0 мМ); серые – кадаверина КД (1.0; 2.5; 5.0 мМ). Для сравнения приведена частота персистенции в стационарной (24-часовой) культуре полиаминпрофицитного штамма MC4100 (без добавки полиаминов)

Эксперименты с полиаминзависимым штаммом *E. coli* SHT03pSOPR, в экспоненциальную культуру которого вносились возрастающие концентрации нетилмицина в диапазоне от субингибиторных до летальных (0.01; 0.1; 0.4; 1.0 мкг/мл), показали концентрационно-зависимое отмирание чувствительных клеток (рис. 4А). При субингибиторной концентрации нетилмицина (0.01 мкг/мл) количество культивируемых клеток не отличалось от их числа в контрольной культуре. При сублетальных концентрациях (0.1 и 0.4 мкг/мл) наблюдалась двухфазная модель отмирания, характерная для получения перисторных клеток [Lewis, 2007]: после 5-часовой обработки антибиотиком наблюдалась гибель основной массы (0.1 мкг/мл) или всех (0.4 мкг/мл) чувствительных клеток. Оставшиеся фракции толерантных клеток показали дальнейший незначительный рост к 48 ч. действия нетилмицина. Концентрация аминогликозида 1.0 мкг/мл оказалась летальной, при которой постепенное отмирание привело к полной гибели всех

клеток в результате 48-часового воздействия антибиотика.

Добавка 5 мМ путресцина в экспоненциальную культуру перед внесением аминогликозида полностью снимала отрицательное действие антибиотика на выживаемость клеток при субингибиторной и сублетальных концентрациях. Летальная концентрация (1.0 мкг/мл), при которой в ПТ<sup>-</sup>-культуре после 48-часового воздействия антибиотика живые клетки отсутствовали, в присутствии путресцина давала снижение числа КОЕ относительно контроля на 1–1.5 порядка (рис. 4Б).

Высокую выживаемость бактериальных клеток при одновременном внесении путресцина с антибиотиком можно объяснить рядом причин. Одна из них – способность полиаминов повышать антибиотикорезистентность штамма, о чем судят по изменению минимальной ингибиторной концентрации [Tkachenko et al., 2012]. Защитный эффект полиаминов на уровне мишени антибиотика проявляется

ся за счет конкурентного связывания полиаминов с рибосомами, поскольку как полиамины, так и аминогликозиды имеют поликатионную природу. К тому же, поликатионная структура полиаминов позволяет им функционировать в качестве ловушек активных форм кислорода. Ингибирование белкового синтеза аминогликозидами сопровождается развитием окислительного стресса в результате повышения продукции гидроксильных радикалов, что усиливает бактерицидный эффект антибиотика [Kohanski et al., 2007]. Было показано, что в условиях повреждающего действия аминогликозидов полиамины проявляют антиоксидантные и ДНК-протекторные свойства, выступая в качестве ловушек свободных радикалов и благодаря способности полиаминов связываться с ДНК и компактизировать ее структуру [Tkachenko et al., 2012]. Эти свойства полиаминов обуславливают повышение выживаемости клеток при действии аминогликозидов.

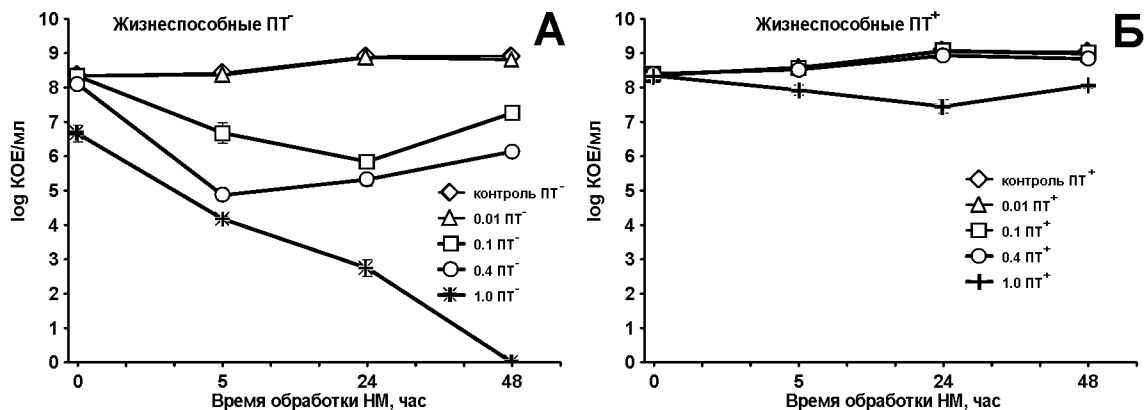


Рис. 4. Кривые отмирания/роста клеток, обработанных возрастающими концентрациями нетилмицина (НМ) (0.01; 0.1; 0.4; 1.0 мкг/мл), в культуре полиаминдефицитного штамма *E. coli* SHT03pSOPR без добавки (А) и в присутствии 5 мМ путресцина (Б)

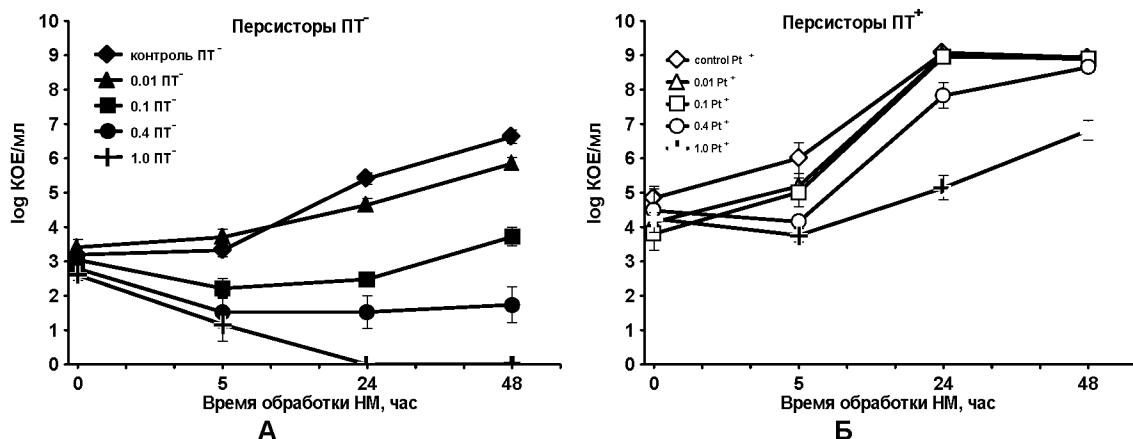


Рис. 5. Динамика персистерных клеток, толерантных к 2.8 мкг/мл нетилмицина, в культуре *E. coli* SHT03pSOPR, предварительно обработанных низкими концентрациями нетилмицина (0.1 – 1.0 мкг/мл), без добавки (А) и в присутствии 5 мМ путресцина (Б)

С целью выяснения, как изменяется содержание персисторов в контрольной и обработанных разными концентрациями (0.1–1.0 мкг/мл) аминогликозида культурах (ПТ<sup>-</sup> и ПТ<sup>+</sup>) после 5-, 24- и 48-часового воздействия антибиотика, из лунок

часового воздействия антибиотика, из лунок планшета параллельно с высевом на подсчет жизнеспособных клеток отбирали аликвоты для определения персисторов. Дополнительная 3-часовая

обработка клеток высокой концентрацией нетилмицина (2.8 мкг/мл) сопровождалась дальнейшим отмиранием чувствительных к данной концентрации клеток (рис. 5). В культурах без добавки путресцина (ПТ<sup>-</sup>) в момент внесения антибиотика количество персистеров к 2.8 мкг/мл нетилмицина было примерно одинаково ( $\approx 10^3$  клеток). В контрольной культуре и культуре, подвергнутой субингибиторной концентрации антибиотика (0.01 мкг/мл), в экспоненциальной фазе роста (0–5 ч.) число толерантных клеток к 2.8 мкг/мл нетилмицина сохранялось на одном уровне с последующим возрастанием их количества при переходе в стационарную фазу (24–48 ч.). При этом в контрольной культуре наблюдалось их незначительное превышение. В культурах, обработанных сублетальными концентрациями нетилмицина (0.1; 0.4 мкг/мл), дополнительное стрессирование высокой концентрацией антибиотика выявило похожую картину, как и в случае с предварительной обработкой СЛК (рис. 4): число клеток, толерантных к сублетальным концентрациям после 5-часовой обработки, снизилось на порядок после дополнительного воздействия 2.8 мкг/мл аминогликозида и далее сохранялось на этом же уровне (0.4 мкг/мл) или даже показало незначительный рост (0.1 мкг/мл). В популяции клеток, толерантных к 1.0 мкг/мл нетилмицина после 24-часовой обработки, персистеров к 2.8 мкг/мл антибиотика не оставалось. Полученные нами результаты согласуются с гипотезой о гетерогенности бактериальных популяций, содержащих различные персистерные субпопуляции, для каждой из которых характерны свойственные им уникальные механизмы толерантности [Allison, Brynildsen, Collins, 2011], что обусловлено, в свою очередь, разнообразием генов, принимающих участие в формировании персистерного фенотипа [Amato et al., 2014].

Количество персистерных клеток, толерантных к 2.8 мкг/мл нетилмицина, в культурах с добавлением путресцина (ПТ<sup>+</sup>) было на 1–2 порядка выше, чем в ПТ<sup>-</sup>-культурах в экспоненциальной фазе роста, достигая максимального различия (до 7 порядков) в стационарных культурах. Различия в содержании персистеров в ПТ<sup>-</sup> и ПТ<sup>+</sup>-культурах в нулевой точке (момент внесения полиамина и антибиотика в экспоненциальной фазе), предположительно, можно объяснить тем, что добавка полиаминов повышает антибиотикорезистентность полиаминдефицитного штамма *E. coli* SHT03pSOPR.

Следует отметить, что динамика персистообразования в ПТ<sup>+</sup>-культурах, предварительно стрессированных нетилмицином в диапазоне концентраций от субингибиторной до летальной, полностью отражает таковую в контрольной культуре с возрастанием числа персистеров до максимума в стационарной фазе роста. При этом число персисто-

ров в контроле и в культурах, обработанных субингибиторной (0.01 мкг/мл) и сублетальной (0.1 мкг/мл) концентрациями антибиотика, достигало максимума уже в 24-часовых культурах и к 48 ч. не изменялось, что соответствовало числу жизнеспособных клеток, высеваемых до дополнительного стрессирования высокой концентрацией нетилмицина (рис. 4Б). Таким образом, добавка путресцина в экспоненциальной фазе роста способствовала переходу всех культивируемых клеток (в том числе жизнеспособных, выживающих после предварительной обработки 0.01 и 0.1 мкг/мл нетилмицина) в персистерное состояние, обеспечивающее толерантность к 2.8 мкг/мл нетилмицина во время вступления в стационарную фазу. В культурах, стрессированных сублетальной (0.4 мкг/мл) и летальной (1.0 мкг/мл) концентрациями нетилмицина, отмечалось пропорциональное концентрационно-зависимое снижение числа персистеров по отношению к контролю. Однако динамика персистообразования в этих культурах также, как и в описанных выше, показала стабильное возрастание числа персистеров до максимума к 48 ч. Максимальное содержание персистеров в стационарных культурах, когда происходит замедление клеточного метаболизма, свидетельствует в пользу того, что в процессе персистообразования принимают участие гены, продукты которых накапливаются в стационарной фазе роста.

## Заключение

Таким образом, полиамины вызывают повышение выживаемости бактерий при действии аминогликозида нетилмицина в диапазоне от субингибиторных до летальных концентраций. В культуре полиаминзависимого мутанта добавка полиаминов приводит к концентрационно-зависимому возрастанию персистообразования до уровня профицитных штаммов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-44-590279-р\_а).

## Библиографический список

- Allison K., Brynildsen M., Collins J. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them // *Current Opinion in Microbiology*. 2011. Vol. 14. P. 593–598.
- Amato S. et al. The role of metabolism in bacterial persistence // *Frontiers in Microbiology / Microbial Physiology and Metabolism*. 2014. Vol. 5. Art. 70.
- Datsenko K., Wanner B. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2000. Vol. 97,

- № 13. P. 6640–6645.
- Dörr T., Vulić M., Lewis K. Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB toxin in *Escherichia coli* // PLoS Biology. 2010. Vol. 8, № 2. e1000317.
- Igarashi K., Kashiwagi K. Polyamine Modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines // Journal of Biochemistry. 2006. Vol. 139. P. 11–16.
- Jana S., Deb J. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance // Applied Microbiology and Biotechnology. 2006. Vol. 70. P. 140–150.
- Gefen O., Balaban N. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress // FEMS Microbiology Reviews. 2009. Vol. 33. P. 704–717.
- Keren I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials // FEMS Microbiology Letters. 2004. Vol. 230. P. 13–18.
- Kohanski M. et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // Cell. 2007. Vol. 130, № 5. P. 797–810.
- Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease // Nature Reviews Microbiology. 2007. Vol. 5. P. 48–56.
- Lewis K. Persister cells // Annual Review of Microbiology. 2010. Vol. 64. P. 357–372.
- Shakil S. et al. Aminoglycosides versus bacteria - a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground // Journal of Biomedical Science. 2008. Vol. 15. P. 5–14.
- Tabor C., Tabor H. Polyamines in microorganisms // Microbiological reviews. 1985. Vol. 49. P. 81–99.
- Tkachenko A. et al. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics // Research in Microbiology. 2012. Vol. 163, № 2. P. 83–91.
- Tkachenko A. et al. Putrescine controls the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to aminoglycoside netilmicin // FEMS Microbiology Letters. 2014. Vol. 361. P. 25–33.
- tabolism. V. 5 (2014): Art. 70.
- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. V. 97, № 13 (2000): pp. 6640–6645.
- Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biology*. V. 8, № 2 (2010): e1000317.
- Igarashi K., Kashiwagi K. Polyamine Modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. *Journal of Biochemistry*. V. 139 (2006): pp. 11–16.
- Jana S., Deb J. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. V. 70 (2006): pp. 140–150.
- Gefen O., Balaban N. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiology Reviews*. V. 33 (2009): pp. 704–717.
- Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*. V. 230 (2004): pp. 13–18.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. V. 130, № 5 (2007): pp. 797–810.
- Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*. V. 5 (2007): pp. 48–56.
- Lewis K. Persister cells. *Annual Review of Microbiology*. V. 64 (2010): pp. 357–372.
- Shakil S., Khan R., Zarrilli R., Khan A.U. Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of Biomedical Science*. V. 15 (2008): pp. 5–14.
- Tabor C., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiological reviews*. V. 49 (1985): pp. 81–99.
- Tkachenko A., Akhova A., Shumkov M., Nesterova L. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. *Research in Microbiology*. V. 163, № 2 (2012): pp. 83–91.
- Tkachenko A., Kashevarova N., Karavaeva E., Shumkov M. Putrescine controls the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to aminoglycoside netilmicin. *FEMS Microbiology Letters*. V. 361 (2014): pp. 25–33.

## References

Поступила в редакцию 26.08.2016

**Об авторах**

Кашеварова Наталья Михайловна, мл. науч. сотр. лаборатории адаптации микроорганизмов ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН  
614081, Пермь, ул. Голева, 13; nkashev@mail.ru; (342)2122159

Ткаченко Александр Георгиевич, доктор медицинских наук, зав. лабораторией адаптации микроорганизмов  
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН  
614081, Пермь, ул. Голева, 13;  
agtkachenko@iegm.ru; (342)2122159  
профессор кафедры микробиологии и иммунологии  
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»  
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

**About the authors**

Kashevarova Natalya Mikhailovna, research scientist of the laboratory of microorganisms adaptation  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; nkashev@mail.ru; (342)2122159

Tkachenko Alexander Georgievich, head of the laboratory of microorganisms adaptation  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; agtkachenko@iegm.ru; (342)2122159  
professor, Department of Microbiology and immunology  
Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990