

УДК 616.002

ОБЗОР МЕТОДОВ БОРЬБЫ С МИКРОБНЫМИ БИОПЛЁНКАМИ
ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

П.А. ХРЕНОВ, Т.В. ЧЕСТНОВА

Тульский государственный университет, Медицинский институт, Тула, Россия
E-mail: Hrenov.pawel@yandex.ru, тел.: (4872)26-36-44

Аннотация: статья посвящена анализу материала о микробных биоплёнках, их роли в патогенезе воспалительных заболеваний. Подчёркивается, что в биоплёнках микроорганизмы более устойчивы к факторам внешней среды. Также проводится анализ результатов исследований, по данным различных авторов, направленных на борьбу с биоплёнками.

Ключевые слова: микробные биоплёнки, матрикс, воспалительные заболевания.

THE MICROBIAL BIOFILMS AT THE INFLAMMATORY DISEASES:
GENERAL INFORMATION AND METHODS OF STRUGGLE AGAINST THEM

P.A. KHRENOV, T.V. CHESTNOVA

Tula State University, Medical Institute
E-mail: Hrenov.pawel@yandex.ru, tel.: (4872)26-36-44

Abstract: the article presents the analysis of the materials about microbial biofilms, their role in the pathogenesis of inflammatory diseases. It is underlined that microorganisms are more resistant to environmental factors in biofilms. The analysis of the results of studies aimed at combating with biofilms is carried out,

Key words: microbial biofilm, matrix, inflammatory diseases.

Впервые о роли бактериальных биоплёнок в формировании инфекций различной локализации заговорили более 25 лет назад. В настоящее время считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в форме биоплёнок [15].

Биоплёнки это высокоупорядоченные сообщества бактерий, формирующиеся на биологических или искусственных поверхностях в результате адгезии, роста и размножения микроорганизмов и образования полисахаридного внеклеточного матрикса [11]. Биопленки представляют собой образования, состоящие из живых клеток (около 15%), погруженных в виде микроколоний в экзополимер-полисахаридный матрикс (на долю которого приходится около 85% объема) [13].

В состав поверхностной оболочки и матрикса биопленок входят белки, полисахариды, липиды и нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) [20, 21].

В цикле формирования биопленки выделяют 4 стадии с общими особенностями, независимо от типа микроорганизмов:

1. Стадия адгезии;
2. Стадия необратимого связывания с поверхностью;
3. Стадия созревания;
4. Стадия распространения [10].

В связи с большей агрессивностью патогенных микроорганизмов по сравнению с комменсалами происходит преимущественное заселение ими любых инородных тел, вводимых в организм человека. Биоплёнки образуются на постоянных катетерах, эндоскопах, внутренних имплантатах, контактных линзах и протезах. В наибольшей степени адгезии микроорганизмов способствуют полиэтиленовые и поливиниловые устройства, в наименьшей – силиконовые, тефлоновые и полиуретановые, однако до настоящего времени не существует материалов, применение которых одновременно было безвредно для макроорганизма и исключало бы биологическое обрастание [4]. Специальные исследования показали, что в биопленке по-иному, в сравнении с чистыми культурами бактерий, происходят их многочисленные физиологические процессы, в том числе продукция метаболитов и биологически активных веществ. Сообщество организует единую генетическую систему в виде плазмид-кольцевых ДНК, несущих поведенческий код для членов биопленки, определяющих их пищевые (трофические), энергетические и другие связи между собой и внешним миром. Последнее получило специальное определение как социального поведение (quorum sensing) микроорганизмов. Реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биопленке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре. Такая организация обеспечивает ее физиологическую и функциональную стабильность и, следовательно, является залогом конкурентного выживания в экологической нише. В организме человека специфическое преимущество такой организации заключается в обеспечении гомеостаза органов, функциональность которых зависит от населяющих их микробов. Преимущество коллективного реагирования имеет и отрицательную сторону: таким сообществом трудно управлять извне. Например лечить заболевания полимикробного происхождения, когда чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, ассоциированных в биопленку, не соответствует таковой, определенной в лабо-

раторных тестах на клинических изолятах чистых культур бактерий. Коллективный иммунитет биопленки практически сводит на нет возможность коррекции дисбактериозов с помощью пробиотиков (препаратов живых культур ключевых микроорганизмов кишечника: бифидобактерий, лактобацилл, энтеробактерий и других) [9].

К настоящему времени накопилось значительное количество данных о том, что микроорганизмы в составе биопленки влияют на течение хронических воспалительных заболеваний. Биопленки обладают высоким уровнем толерантности к антителам, антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и фагоцитам [2]. К сожалению, стандартные методы антибактериального лечения направлены на отдельно существующие планктонные клетки, тогда как бактерии внутри биопленки размножаются и вновь диссеминируют после завершения курса лечения, нередко формируя очаги хронической персистирующей инфекции, способствуя рецидивированию заболевания [15].

По мнению А. Гинцбург, очаги биопленок появляются при всех рецидивирующих инфекционно-воспалительных заболеваниях. Когда биопленки достигают определенного размера, от них начинают отрываться части, которые разносятся с кровотоком по организму. Происходит образование новых очагов биопленки, что можно рассматривать как аналог метастазирования злокачественных клеток [10].

К числу заболеваний, связанных с присутствием биопленок, относят инфекции мочевых путей (вызванные *E. coli* и другими бактериями), мочекаменную болезнь, *катетер-ассоциированные инфекции кровотока* – КАИК (золотистый и коагулазонегативные стафилококки, другие бактерии и грибы рода *Candida*), стоматологические проблемы (зубной камень, кариес, гингивит), хронический простатит, инфекции среднего уха у детей (обусловленные, например, *Haemophilus influenzae*), хронический синусит, *хроническую obstructивную болезнь лёгких* (ХОБЛ), муковисцидоз, инфекционный эндокардит, хронический остеомиелит, инфекции протезированных клапанов и суставов и т.д. [18].

Сейчас не вызывает сомнений необходимость пересмотра концепции патогенеза различных хронических инфекций, используя имеющиеся данные о биопленках. В практическом отношении это требует внедрения новых методов диагностики и лечения. Среди методов, которые позволяют идентифицировать микроорганизмы в составе биопленок, можно назвать современные молекулярные методы (электрофорез в геле и высокоэффективную жидкостную хроматографию с флуоресцентной гибридизацией *in situ*). В клинических лабораториях всё шире используют *полимеразную цепную реакцию* (ПЦР), ПЦР с обратной транскриптазой, быстрое секвенирование и другие исследования [12].

Терапевтическое воздействие на биопленки может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к поверхности, блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также оно может сочетаться с собственно бактерицидными агентами. Подобное лечение, действующее на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная терапия [14].

Одним из перспективных методов является сочетанное применение этиотропного антибактериального препарата в комбинации с кларитромицином (антибиотик из группы макролидов). Детальное изучение механизма действия препарата кларитромицин на образование биопленки, позволило выявить, что структура биопленки изменяется, уменьшается количество альгината, гексозы, истончается гликокаликс, тем самым повышается проникновение антимикробного препарата, который использовали для подавления синегнойной палочки в данном исследовании – фторхинолон. Эффективность фторхинолона оказалась значительно выше в присутствии кларитромицина, что привело к эрадикации синегнойной палочки. Проводились также клинические исследования на больных с муковисцидозом и диффузным панбронхиолитом, в ходе которых было показано совместное использование для воздействия на синегнойную палочку кларитромицина с этиотропными антибиотиками [23].

Выявлена новая мишень – внеклеточная ДНК матрикса биопленок для воздействия на бактерии с целью повышения эффективности антибиотикотерапии. Использование ДНК матрикса, как дополнительной мишени при терапии, позволяет повысить эффективность действия различных антибиотиков на неродственные микробы, находящиеся в биопленках, снизить вероятность возникновения, распространения и сохранения устойчивости к лечебному агенту, сократить общую продолжительность терапии, уменьшить сроки пребывания больных в стационаре и снизить частоту рецидивов заболевания [7].

Способом улучшения проникновения в биопленку антимикробных препаратов может являться и совершенствование форм их доставки [22]. Известно, что липосомальный комплекс амфотерицина В обладает выраженной активностью по отношению к резистентным биопленкам, продуцируемым *Candida spp.*, что позволяет использовать его при инвазивных системных микозах [5,8,17].

Целью одного из исследований являлась оценка клинической эффективности комбинации тиамфеникола (антимикробный препарат группы амфениколов с широким спектром активности, включающим аэробные грамположительные и грамотрицательные возбудители, а также некоторые анаэробы) с N-ацетилцистеином для терапии пациентов с хроническим риносинуситом. В первый день пациенты получали комбинированный препарат парентерально (внутримышечно), затем в виде аэрозоля в течение еще 9 дней. К окончанию терапии клиническое и бактериологическое выздоровление (эрадикация биопленок была подтверждена культуральным методом и сканирующей электронной микроскопией) составило 88% (21/24) [16].

Результатами пилотного сравнительного клинического исследования N-ацетилцистеина в педиатрической практике являются выводы о том, что использование препарата у пациентов с рецидивирующими инфекциями верхних дыхательных путей ведет к снижению частоты обострений заболевания [19].

Было проведено исследование на модели *in vitro* сочетанного действия лактоферрина и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс формирования биоплёнок *P. aeruginosa*, являющимися возбудителями оппортунистических инфекций. Комбинированный эффект воздействия лактоферрина и ципрофлоксацина заключается в том, что при использовании низких концентраций антибиотика интенсивность процесса формирования биоплёнок клетками культуры *P. aeruginosa* значительно уменьшается и может оказаться эффективной альтернативой для лечения иммунодефицитных больных с целью предотвращения возникновения хронических очагов инфекции [1].

Авторами исследования [6] также изучалось влияние на процесс образования биоплёнок ципрофлоксацина, но в комбинации с окситоцином. Проводились экспериментальные исследования на моделях *in vitro* и *in vivo* комбинации окситоцина и ципрофлоксацина на биоплёнкообразование представителей условно-патогенной микрофлоры изолированной из гнойных ран (грамположительных – *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, грамотрицательных палочек – *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и облигатно-анаэробные микроорганизмы – *B. Fragilis*). На модели *in vitro* авторы применяли ½ минимальной подавляющей концентрации окситоцина и ципрофлоксацина, при этом образование биоплёнок угнеталось на 35-57% по сравнению с контролем. Особенно эффективной данная комбинация оказалась в отношении *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. anaerobus*. Экспериментальные исследования *in vivo* подтвердили более высокую эффективность местного применения комбинации ципрофлоксацина с окситоцином на гидрофильной основе, по сравнению с использованием в лечении гнойных ран ципрофлоксацина или окситоцина в отдельности, что выражалось в более ранних сроках очищения ран, появлении краевой эпителизации и нормализации показателей периферической крови. В 1 группе животных (комбинация ципрофлоксацина с окситоцином) на 3 и 5 день лечения посевы из раневого секрета не давали роста микрофлоры в 91,7% случаев, в то время как у животных 2, 3 и 4 групп этот показатель был на уровне 50-58,4% и менее. При световой микроскопии патологического материала, полученного из ран на 1 сутки, выделены единичные скопления микробных клеток без признаков биоплёнкообразования у крыс всех исследуемых групп. При проведении лечебных мероприятий к 3-5 суткам отмечалось полное отсутствие микробных биоплёнок в ране у 83,3-91,7% крыс 1 группы, тогда как во 2 группе (монотерапия антибиотиком) данный показатель составил 50-66,7%. Лечение крыс одним окситоцином практически не влияло на образование биоплёнок бактериями: микроскопическое исследование патологических образцов из ран крыс 3 группы было сходно с контрольной группой крыс (не получавших лечение) и выявило наличие сформировавшихся (зрелых) биоплёнок, занимающих большую часть поля зрения у всех животных [6].

Весьма интересные результаты получены авторами исследования [3]. Выделенный из штамма почвенной бактерии *Pseudomonas batumici* антибиотик батумин, по данным авторов, в ½ минимальной подавляющей концентрации, показал высокую эффективность в подавлении биоплёнок у стафилококков с высоким уровнем биоплёнкообразования. Напротив, у штаммов с низкими показателями биоплёнкообразования было отмечено усиление образования биоплёнок под действием батумина. Аналогичные результаты авторы получили при исследовании биоплёнкообразования *Candida albicans*. У грамотрицательных микроорганизмов препарат стимулировал биоплёнкообразование лактозоположительных негемолитических эшерихий независимо от исходного уровня биоплёнкообразования.

Заключение. Анализ имеющихся литературных данных убедительно демонстрирует роль биоплёнок в патогенезе воспалительных заболеваний и их участие в хронизации воспалительного процесса. Полученные в ходе исследований разных авторов данные, имеют важное значение для понимания патогенеза воспалительных заболеваний и новым подходам к терапии хронических инфекций. Также, учитывая новые данные, при определении минимальной подавляющей концентрации антибиотиков для клинически значимых штаммов микроорганизмов следует учитывать чувствительность не только чистых культур, но и влияние препаратов на биоплёнкообразование. Воздействие на биопленки может быть направлено на блокирование механизмов адгезии бактерий к поверхности, синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также оно может сочетаться с собственно бактерицидными агентами. Результаты исследований по данным направлениям приносят положительные результаты и внедряются в клиническую практику. Например, по данным литературы, в клинической практике используется комбинация антимикробных препаратов с кларитромицином, применение которого позволяет как сократить сроки пребывания в стационаре, так и снизить частоту развития осложнений. Безусловным является пересмотр современных представлений о патогенезе воспалительных заболеваний с позиций имеющихся данных о микробных биоплёнках.

Литература

1. Алексеева, Н.В. Разработка средств борьбы с биоплёнками: влияние препарата «Лапрот» (на основе человеческого лактоферрина) и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс образования биоплёнок бактериями *Pseudomonas aeruginosa in vitro* / Н.В. Алексеева, Т.В. Степанова, Э.Р. Толордава //

Медицинский алфавит. Лаборатория.– 2010.– № 3.– С. 4–9.

2. *Афиногенова, А.Г.* Микробные биоплёнки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России.– 2011.– № 3.– С. 119–125.

3. *Бухарин, О.В.* Влияние антистафилококкового антибиотика батумина на биоплёнкообразование микроорганизмов / О.В. Бухарин, Л.Н. Чуркина, Н.Б. Перунова // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии.– 2012.– № 2.– С. 8–12.

4. *Доброхотский, О.Н.* Эпидемиологическое значение биоплёнок в технических системах / О.Н. Доброхотский, Ю.Н. Хомяков, Т.И. Хомякова // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие.– 2008.– № 4.– С. 78–80.

5. *Иванова, Н.Н.* Антигрибковая активность липосомального тербинафина в отношении биоплёнок *Candida albicans*. / Н.Н. Иванова, В.Н. Васильченко, А.П. Белозёров // Дерматология и венерология.– 2010.– №1.– С. 36–40.

6. *Скоробогатых, Ю.И.* Экспериментальное изучение комбинации ципрофлоксацина с окситоцином на образование биоплёнок условно патогенными бактериями / Ю.И. Скоробогатых, Н.В. Перунова, П.П. Курлаев // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии.– 2010.– № 6.– С. 3–7.

7. *Тец, Г.В.* Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биоплёнок с антибиотиками (экспериментальное исследование): автореф. дис. канд. мед. наук / Г.В. Тец.– Санкт-Петербург, 2007.– 23 с.

8. *Честнова, Т.В.* Медицинская микология. / Т.В. Честнова, Н.В. Серёгина // Учебно-методическое пособие / «Тулский полиграфист» 2010.– С. 5–6.

9. *Честнова, Т.В.* Современные представления о физико-химических особенностях существования бактерий в составе биоплёнок. / Т.В. Честнова, Н.В. Серёгина // Общественное здоровье и здравоохранение: профилактическая и клиническая медицина // XXXXV научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава ТулГУ / ТулГУ, 2009.– С. 138.

10. *Шуб, Г.М.* Материалы к элективному курсу «Микробные сообщества» / Г.М. Шуб, И.Г. Швиденко, Е.А. Пронина, Н.В. Белобородова // Саратовский научно-медицинский журнал.– Том 6.– 2010.– № 2.– С. 245–247.

11. *Aparna, M.S.* Biofilms: microbes and disease / M.S. Aparna, S. Yadav // Braz J Infect Dis.– 2008– № 12 (6).– P. 526–530.

12. BMC Microbiol / S.E. Dowd [et al.].– 2008.– Vol. 8.– P. 43.

13. *Douglas, I.J.* Candida biofilms and their role in infection / I.J. Douglas // Trends Microbiol.– 2003.– Vol. 11.– № 1.– P. 30–36.

14. Antimicrob. Agents Chemother. /G.D. Ehrlich [et al] // – 2003.– Vol. 47.– P. 317.

15. *Lewis, K.* Persister cells and the riddle of biofilm survival / K. Lewis // Biochemistry.– 2005.– № 54.– P. 49–79.

16. Efficacy of N-acetylcysteine in combination with thiamphenicol in sequential (intramuscular/aerosol) therapy of upper respiratory tract infections even if sustained by bacterial biofilms / A. Macchi [et al.] // J Chemother.– 2006.– № 18.– P. 507–13.

17. *Moen, M.D.* Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections / M.D. Moen, K.A. Lyseng-Williamson, K.A. Scott // Drugs. 2009.– Vol 69.– P. 361–392

18. *Parsek, M.R.* Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis / M.R. Parsek, P.K. Singh // Annu Rev Microbiol.– 2003.– Vol. 57.– P. 677–701.

19. *Pintucci, J.P.* Biofilms and infections of the upper respiratory tract / J.P. Pintucci, S. Corno, M. Garotta // Eur Rev Med Pharmacol Sci.– 2010.– Vol.14.– P. 683–90.

20. *Sutherland, I.W.* Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework / I.W. Sutherland // Microbiology.– 2001.– Vol. 147.– P. 3–9.

21. *Sponza, D.T.* Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions / D.T. Sponza // Enzyme Microb Technol.– 2003.– Vol.32.– P. 375–385.

22. *Smith, A.W.* Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? / A.W. Smith // Adv Drug Deliv Rev.– 2005.– Vol. 29.– P. 1539–1550.

23. *Wozniak, D.J.* Effects of Subinhibitory Concentrations of Macrolide Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* / D.J. Wozniak, R. Keyser // Chest.– 2004.– Vol.125 – P. 625–695.