

Ю.С. ВИННИК, О.В. ПЕРЬЯНОВА, Е.В. ОНЗУЛЬ, О.В. ТЕПЛЯКОВА

## **МИКРОБНЫЕ БИОПЛЁНКИ В ХИРУРГИИ: МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ, ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ, ПУТИ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ**

ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»,  
Российская Федерация

Научный обзор посвящён значению микробных биоплёнок в формировании очагов хирургической инфекции. Изложены механизмы образования биоплёнки, особенности структурной организации, формирования лекарственной резистентности. Приведены примеры участия микробных сообществ в кардиохирургической и урологической практике, а также в инициации катетер-ассоциированных инфекций. Рассмотрены проблемы и перспективы лекарственного и немедикаментозного воздействия на бактерии в составе биоплёнки.

*Ключевые слова:* биоплёнка, резистентность, адгезия, ультраструктура, образование микробных сообществ, биоциды

The scientific review is devoted to the meaning of microbial biofilms in forming of surgical infection foci. The mechanisms of forming biological films, peculiarities of structural organization and development of drug resistance are presented. Some examples of participation of microbial communities in the cardiac surgical and urological practice as well as in the initiation of catheter associated infections are given. The problems and the perspectives of the potential therapeutic and non-therapeutic effects to bacterial cells in the composition of biofilms are also discussed.

*Keywords:* biofilms, drug resistance, adhesion, ultrastructure, formation of microbial communities, biocides

Несмотря на широкое распространение высоких технологий в современной хирургии, проблема хирургической инфекции относится к числу приоритетных [1, 2, 3, 4]. Это обусловлено как частотой заболеваемости, достигающей 35–45% в общей структуре, так и существенными материальными затратами, связанными с потребностью в длительной госпитализации, повторных санационных хирургических вмешательствах, широком арсенале медикаментозного обеспечения. Распространению инфекций, в том числе госпитальных, способствует неудовлетворительное состояние экологии, низкий социально-экономический уровень жизни значительной части населения, снижение факторов неспецифической противомикробной резистентности в условиях бесконтрольного применения лекарственных препаратов.

При лабораторной оценке эффективности антимикробного воздействия до насто-

ящего времени все исследования выполняются на чистых культурах бактерий, выращенных в богатых питательными веществами средах в планктонном виде [5, 6, 7]. Такие условия далеки от реальных, в которых бактерии персистируют в организме тяжёлых септических пациентов [1, 2, 7, 8]. В настоящее время накоплен обширный экспериментально-клинический материал, свидетельствующий, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных средах существует в виде сообществ, окружённых железополисахаридным матриксом и функционирующих как скоординированный консорциум – микробная биоплёнка [9, 10, 11, 12, 13]. Для большинства бактерий состояние биоплёнки (биофильма) является базовым, выработанным в течение миллионов лет под влиянием естественного отбора в меняющихся экологических условиях [14].

Несмотря на многочисленные данные

о способности бактерий образовывать биоплёнки, теория преобладания сообществ микроорганизмов над их свободноживущими формами была постулирована лишь в 1978 году [7, 15, 16]. Согласно ей, бактерии основную часть времени развития и размножения находятся в матриксе, прикрепленном к богатым питательными веществами поверхностям экосистем, и физиологически отличаются от клеток того же штамма, взвешенных в среде. В принципе, планктонную стадию можно рассматривать лишь как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой, то есть кратковременное состояние в жизни бактерий.

В настоящее время общепринято, что биоплёнки развиваются на любом материале, контактирующем с жидкостью, где в принципе могут существовать микроорганизмы. Фактически любая поверхность как биогенного, так и абиогенного происхождения, колонизирована микроорганизмами, и, следовательно, на всех этих поверхностях закономерно формируются биоплёнки. Более того, ни для одного вида бактерий не описано существование только в планктонном состоянии при всех возможных условиях роста [17, 18, 19].

Наиболее ёмкое определение биоплёнки состоит в следующем. Биоплёнка – микробное сообщество, характеризующееся клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфических генов [20, 21, 22, 23, 24]. Это определение позволяет отличить микробные сообщества биоплёнок от внешне похожих на них структур, например, колоний бактерий, растущих на поверхности агара, которые не проявляют ни одной из характеристик, свойственных истинной био-

плёнке. Важно отметить, что бактерии, включенные в матрикс фрагментов, которые отрываются от биоплёнок на колонизированном медицинском устройстве и циркулируют в жидкостях тела, устойчиво проявляют все фенотипические характеристики исходной биоплёнки [25, 26].

Показано, что микробные биоплёнки ответственны за этиологию и патогенез многих острых и, особенно, хронических воспалительных заболеваний [3, 7]. По данным Центра по контролю заболеваемости США, до 80% инфекционной патологии человека может быть связано с формированием биоплёнок [27]. Наиболее часто в их составе встречаются *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.* В природных экосистемах биоплёнка – почти неизменно многовидовое микробное сообщество, где каждый микроорганизм находится в собственной микронше в едином матриксе биопленки. Несмотря на то, что многовидовые биопленки более распространены в природе, наибольший клинический интерес представляют одновидовые сообщества. Как правило, одновидовые биофильмы развиваются на медицинских имплантатах и вносят свой вклад в разнообразие инфекций, вызываемых персистирующими бактериями [3, 28, 29].

К настоящему времени достоверно доказана роль микробных биоплёнок в возникновении и развитии как внебольничной, так и госпитальной инфекции [2, 3, 30]. К первой группе относятся такие заболевания, как инфекции кожи и мягких тканей, кариес, периодонтит, остеомиелит, простатит, эндокардит, инфекции желче- и мочевыводящих путей. Все эти заболевания трудны для лечения, имеют высокую частоту рецидивов, большинство из них может явиться причиной летального исхода.

Далеко не до конца ясны механизмы, по которым микроорганизмы, образующие биоплёнку, вызывают патологические процессы в макроорганизме. В доступной литературе описаны четыре возможных варианта этих механизмов [7, 19, 20, 31], а именно:

- отрыв клеток или агрегатов клеток от растущих на медицинских устройствах (катетерах, дренажах, имплантатах, протезах, эндотрахеальных трубках, контактных линзах) биопленок и выход их в кровяное русло и другие экосистемы макроорганизма;

- синтез микроорганизмами в биоплёнках особых эндотоксинов;

- повышенная резистентность микроорганизмов в биоплёнках к компонентам иммунной системы хозяина;

- появление в биоплёнке популяции сверхустойчивых к антимикробной терапии микроорганизмов (например, путём обмена плазмидами).

В лабораторных исследованиях показано, что увеличение скорости или изменение направления потока жидкой фазы приводит к отрыву клеток от исходной биоплёнки [32, 33]. Отделение клеток или их агрегатов от биоплёнки может быть связано с изменениями концентрации субстрата, который омывает биоплёнку. Целым рядом работ доказано, что биоплёнки грамотрицательных бактерий, находящихся на поверхностях медицинских устройств, синтезируют эндотоксины [7, 10, 13, 25]. Показано, что общее микробное число в биоплёнках на гемодиализных трубках коррелировало с концентрациями продуцируемых ими эндотоксинов [34]. Однако ни в одном из исследований не сообщается о кинетике диффузии эндотоксинов из биопленок, их концентрациях внутри и вне биофильма. Установлено, что экзополисахариды *Staphylococcus epidermidis* препятствуют фагоцитарной активности макрофагов [35, 36]. В экспериментах на кроликах [25, 37] оказалось, что фагоциты не действо-

вали на бактерии биоплёнки, выросшие на внедренном в брюшину медицинском устройстве. Привитые животные имели 1000-кратный титр антител, но они не достигали бактериальных клеток, заключённых в биоплёнку. На основании этих данных можно предположить, что отделившиеся от биоплёнки на медицинском устройстве микроорганизмы с большей лёгкостью, чем планктонные клетки аналогичного вида, способны преодолеть иммунный барьер и вызвать заболевание.

В ряде работ отмечено, что бактерии в биоплёнках могут обмениваться плазмидами, содержащими гены, ответственные за их резистентность к антибиотикам [5, 27, 38, 39]. Описан обмен плазмидами между различными микроорганизмами полости рта [13]. Физическая близость клеток в биопленках облегчает обмен плазмидами по тому же механизму, что и среди планктонных микроорганизмов. Показано, что обмен плазмидами между разными видами *Pseudomonas* был значительно выше в биопленках, чем во взвешенной культуре [30, 31, 39, 40]. Появление резистентных микроорганизмов особенно опасно в случае их роста и размножения в условиях стационара, поскольку они способны распространяться от пациента к пациенту через руки медперсонала [7, 14, 25].

Актуальность проблемы протезного инфекционного эндокардита либо участие биопленок в развитии инфекций, связанных с другими имплантатами, растёт пропорционально развитию кардиохирургии и потребности в различных синтетических материалах, клапанах, биопротезах [20, 26, 41]. Теоретически очевидно, что для микроорганизмов экологически выгодно прикрепление к материалу протезного клапана и использование прилегающей к нему ткани в качестве источника питания. В то же время у большинства пациентов с протезами клапанов сердца и другими имплан-

татами, благодаря неизвестным пока механизмам, случайно прикрепившиеся бактерии в этом локусе «ведут себя» достаточно пассивно. По-видимому, складываются какие-то симбиотические отношения, которые не приводят к активному размножению бактерий и, соответственно, препятствуют развитию воспалительной реакции [7, 20, 42]. Необходимость изучения экологических оптимумов возникновения и существования микробных биоплёнок на фазовой границе между абиогенной поверхностью механических протезных клапанов и тканями сердца несомненна. После создания адекватной модели *in vitro* будет возможен экспериментальный поиск новых методов профилактики и лечения.

Методами электронной микроскопии доказано наличие микробных биопленок на катетерах, причем не только в области просвета катетера, но и на внешней его стороне [15, 43]. Показано, что биоплёнки на катетерах, установленных на сроки менее 10 дней, формируются в основном на внешней поверхности катетера, а у катетеров, установленных на более длительные сроки (10–30 дней), возникает обратная тенденция [19]. Поскольку катетер находится в прямом контакте с кровяным руслом, его поверхность покрывается форменными элементами крови и белками (альбумин, фибриноген, фибронектин и т.д.), что облегчает адгезию микроорганизмов.

Научный поиск, связанный с изучением биоплёнок, находится в самом начале пути, однако потребность решения практических медицинских задач, связанных с биоплёнками, давно назрела. Известно немало разработок, необходимых для покрытия синтетических материалов, протезов, имплантируемых устройств [1, 16, 31]. Например, в литературе описан посеребрённый механический сердечный клапан, который был разработан для предотвращения адгезии микроорганизмов [35, 36]. Авторы

имплантировали этот материал в морскую свинку, заражённую *Staphylococcus epidermidis*. Оценивая воспаление, они показали, что покрытый материал вызвал меньший воспалительный ответ. Однако, по данным целого ряда авторов [2, 20, 30], серебрение протеза недостаточно эффективно. Описан случай, когда, несмотря на покрытие серебром протезного клапана, эндокардит всё равно развился, что привело к необходимости его замены. Авторы отмечают, что покрытие серебром клапана может быть эффективно *in vitro*, но *in situ* это не защищает ткани, окружающие протез, во всяком случае, в долговременной перспективе [35].

Что касается венозных катетеров, к настоящему времени предложено несколько стратегий предотвращения развития биопленок. К ним относятся: использование антибактериальных мазей; уменьшение длины катетера; использование фильтров для жидкостей, поступающих в катетер; покрытие стенок просвета катетера антибактериальными препаратами [5, 7, 26]. Однако действительно эффективные практические решения могут быть найдены только после получения ответов на теоретические вопросы, связанные с формированием и функционированием биоплёнок.

Для каждого вида, безусловно, существуют свои особенности роста и развития, в то время как образование биоплёнок подчинено некоторым общим закономерностям [25, 34]. Биоплёнки формируются в несколько этапов, требуют межклеточной передачи сигналов, а также транскрибируют гены, отличающиеся от планктонных клеток [14, 27, 38, 39]. Ключевым моментом формирования микробной биоплёнки является процесс адгезии микроорганизма к доступной для дальнейшей колонизации поверхности. Выделяют две группы механизмов адгезии – неспецифическая и специфическая [7]. Неспецифическая адгезия опосредована

физико-химическими взаимодействиями бактерии с поверхностями. К ним относят электростатические и гидрофобные взаимодействия, Ван-дер-Ваальсовы силы, броуновское движение. Неспецифическая адгезия, как правило, обратима.

Специфическая адгезия происходит в результате молекулярных взаимодействий между адгезином микробной клетки и рецептором клетки хозяина. Под адгезинами понимают поверхностные структуры микробных клеток и входящие в их состав макромолекулы, обычно белки, посредством которых осуществляется прикрепление к специфическим поверхностям. Под рецептором подразумевают структуру, комплементарную адгезину и находящуюся на поверхности эукариотической клетки. Функцию рецепторов в процессе адгезии выполняют карбогидраты или пептидные (белковые) фрагменты, локализованные на мембране эукариотических клеток [7, 20, 36].

Совершенствование медицинских технологий, в частности широкое использование искусственных имплантируемых и внутрисосудистых устройств, создало новую экологическую нишу для микроорганизмов. Ни один из используемых для создания имплантатов материалов не является биологически инертным. Микроорганизмы оказываются способными связываться с их поверхностями в результате неспецифической адгезии. Кроме того, на этих поверхностях с разной скоростью происходят отложение белков макроорганизма, чаще всего фибрина, и формирование плёнки, в составе которой присутствуют молекулы, являющиеся рецепторами для адгезинов микроорганизмов [26, 44]. Особенность имплантируемых устройств как субстратов для адгезии микроорганизмов состоит в том, что у них полностью отсутствуют факторы, противодействующие этому процессу. Таким образом, при контакте микроорганизма с поверхностью искусственных

устройств адгезия практически неизбежна.

В дальнейшем события разворачиваются не по тем схемам, которые описаны для адгезии микроорганизмов к живым объектам, обладающим факторами резистентности. Вначале на поверхностях, вероятно, формируются отдельные микроколонии микроорганизмов, которые затем быстро объединяются в сплошную биоплёнку. Биология микроорганизмов в составе биоплёнки отличается некоторыми особенностями [9]. Подавляющее большинство индивидуальных клеток находится в состоянии покоя и, что важно для практики, характеризуется крайне низкой чувствительностью к воздействию антибактериальных агентов [5]. По не совсем понятным причинам в отдельных участках биоплёнки периодически возникают очаги размножения, в результате чего в окружающую среду выделяются свободные (планктонные) клетки микроорганизмов. Этот процесс составляет основу патогенеза катетер-ассоциированных инфекций.

Так, *Staphylococcus epidermidis* синтезирует полисахаридный межклеточный адгезин, который является основой для адгезии клеток друг к другу и последующего формирования биоплёнки [7, 15, 35]. Если биоплёнка состоит из нескольких видов, экзометаболиты (побочные продукты жизнедеятельности) одного микроорганизма могут использоваться для поддержания роста и развития другого. При этом адгезия одного вида может обеспечить лиганды, способствующие прикреплению других. В противоположной ситуации, конкуренция за субстраты или накопление токсичных побочных продуктов, произведенных первичными колонизаторами, может резко ограничить разнообразие видов в биоплёнке [34].

Как только бактерии необратимо прикрепляются к поверхности, начинается процесс созревания биоплёнки. Плотность и сложность биоплёнки увеличивается, так

как связанные с поверхностью микроорганизмы начинают активно размножаться и погибать, а внеклеточные метаболиты, синтезированные прикрепленными бактериями, взаимодействуют с органическими и неорганическими молекулами окружающей среды, создавая матрикс [2, 7]. В случае инфицирования биомедицинского материала, размножение бактерий может спровоцировать начало синтеза хозяином белков воспалительного ответа, белков системы комплемента, фибриногена, фибронектина, глюкозаминогликанов, также прикрепляющихся к инфицированному материалу [15].

Потенциал роста любой бактериальной биоплёнки ограничен количеством питательных веществ в окружающей среде, доступностью их для клеток, находящихся внутри биоплёнки, и возможностью удаления продуктов метаболизма [6, 33]. Кроме того, существует гидродинамический оптимум скорости потока окружающей биоплёнку среды, который в идеале ускоряет рост биоплёнки за счёт оптимизации скорости поступления питательных веществ и удаления экзометаболитов, а в случае увеличения вызывает эрозию внешних слоёв биоплёнки [19, 20]. Есть и другие факторы, которые управляют созреванием биоплёнки, например внутренний рН, парциальное давление кислорода, наличие источников углерода и осмолярность [13, 20].

Когда биоплёнка достигает динамического равновесия и критической массы, то часть клеток, наиболее близких к колонизированной поверхности, погибает из-за недостатка питательных веществ, изменения рН, рО<sub>2</sub>, накопления токсичных метаболитов, другая часть клеток остаётся интактной. Удалённые от колонизированной поверхности слои биоплёнки начинают производить планктонные клетки данного микроорганизма, которые свободно покидают биоплёнку и колонизируют другие поверхности [12].

Недавние исследования показывают, что развитие, созревание и разрушение биоплёнки могут регулироваться на уровне экспрессии генов, отвечающих за синтез сигнальных молекул [27, 41, 45]. У исследованных к настоящему времени грамположительных бактерий сигнальными молекулами являются ацил-гомосериновые лактоны, а у грамотрицательных – короткоцепочечные пептиды [6, 44, 46, 47]. Однако ни у одного из условно-патогенных микроорганизмов, возбудителей гнойно-воспалительных процессов и сепсиса у человека, до сих пор не расшифрована химическая структура большинства сигнальных молекул, а значит, «язык» межклеточных сигналов пока неизвестен. В то же время, доказательством существования «языка» сигнальных молекул является так называемый «quorum sensing», выявленный именно в биоплёнках [36, 47, 48, 49]. По проблеме «коллективного разума» микроорганизмов существует столь обширная литература, что она заслуживает отдельного обзора, выходящего за рамки данной публикации.

После окончательного созревания в биоплёнке устанавливается оптимальная скорость роста и гибели бактериальных клеток, которые обеспечивают идеальные условия для функциональной координации и создания трёхмерной структуры, во многом сходной с эукариотическими тканями [3, 9]. Не случайно в специальной литературе исследователи образно употребляют термины «пятая ткань» или «невидимый орган» в отношении всего микробного сообщества, населяющего человека [13, 16].

В зрелой структурированной биоплёнке бактерии практически не делятся, в том числе и из-за пространственных ограничений, но сохраняют высокую жизнеспособность. В случае голодания эти клетки способны синтезировать ферменты – экзополисахаридные лиазы, разрушающие матрикс. В итоге клетка получает некоторое

количество питательных веществ и освобождается от жесткой структуры, что позволяет ей начать поиск более благоприятных условий [7].

В изучении структуры биоплёнки исторически использовались разнообразные методы визуализации, включая световую микроскопию с компьютерной обработкой изображения, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию [6, 7, 20, 15]. Для характеристики биоплёнок на внедряемых медицинских устройствах, в том числе при инфекции эндокарда, преимущественно использовали электронную микроскопию [12]. Однако использование этих методов способствовало обманчиво упрощённому представлению о биоплёнках, учитывая необходимость полного обезвоживания гидратированного матрикса для электронной микроскопии и эффекты фокального искажения – при световой. Поэтому первоначально биоплёнки воспринимались и описывались как неструктурированные разрастания бактериальных клеток, окруженные экзополисахаридным матриксом.

Применение конфокальной сканирующей лазерной микроскопии для исследования биоплёнок радикально изменило восприятие их структурных и функциональных особенностей. Этот метод дал возможность исследовать биоплёнки *in situ* без ограничений, с которыми сталкивается электронная микроскопия, хотя и при более низких увеличениях. С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии стало ясно, что структура биоплёнок не является гомогенным монослоем микробных клеток [18, 19, 50]. Матрикс биоплёнки состоит из смеси полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других веществ. Бактериальные экзополисахариды – главный компонент матрикса биоплёнки, который некоторые авторы называют также гликокаликсом или слизистым чехлом. Основным его компонентом является связанная

вода. Все биоплёнки высоко гидратированы, некоторые до 73% состоят из внеклеточного материала, включая водные каналы и экзополисахариды [7]. У большинства видов экзополисахаридный матрикс состоит из альгината, являясь преобладающе анионным. Матрикс является трехмерной структурой, которая окружает, закрепляет и защищает прикрепленные к различным поверхностям микроколонии бактерий.

Поры и каналы, пронизывающие всю биоплёнку – очень важная часть ее структуры. Образно их можно сравнить с кровеносной системой ткани биоплёнки. При использовании гранулометрических методов было доказано движение потока жидкости через эти каналы [12]. Они позволяют свободно распространяться по всей толщине биоплёнки низкомолекулярным веществам, таким, как, например флуоресцеин, из чего следует, что эти вещества примерно одинаково доступны всем клеткам биоплёнки. Таким образом, каналы – жизненно важный элемент структуры биоплёнки, непосредственно влияющий на её функции, однако механизмы их формирования и поддержания ещё не вполне ясны. Каналы обеспечивают распространение питательных веществ и обмен продуктами метаболизма с окружающей жидкостью. Например, измерение *in situ* растворённого кислорода с использованием микроэлектродов показало, что кислород, как и субстраты, доступен в любой точке биоплёнки, из чего следует, что каналы транспортируют окисленную жидкость по всей толщине биоплёнки [28]. При этом биоплёнки непроницаемы для достаточно крупных молекул большинства антибиотиков [5].

Интересно, что биоплёнки, сформированные одним видом *in vitro*, при сравнении с ассоциациями, образованными в естественных экосистемах (так называемый смешанный консорциум видов) демонстрируют общие для всех структурные особен-

ности [16]. На структуру биоплёнки влияют многочисленные внешние условия: например, свойства поверхности, количество доступных питательных веществ, видовой состав микробного сообщества, а также гидродинамические условия окружающей среды [14].

При росте в составе биоплёнки бактерии получают некоторую степень защиты от экологических угроз, включая биоциды, антибиотики, антитела, поверхностно активные вещества, бактериофаги, фагоциты, ультрафиолетовое излучение, изменение рН, высушивание, а также получают возможность поддержания гомеостаза путём связывания катионов или токсинов [11, 30, 50].

При выборе рациональной антимикробной химиотерапии инфекционных болезней существует несколько серьёзных препятствий, одно из которых (наряду с генетической и приобретенной устойчивостью бактерий к антибиотикам) связано с бактериями, находящимися в биоплёнке. Концентрации антибиотиков, требуемых для достижения бактерицидного эффекта для микроорганизмов, структурированных в биоплёнку, в некоторых случаях, в зависимости от природы антибиотика, может быть в 10–100 раз выше, чем для планктонных форм данной бактерии [38]. Стандартное лечение антибиотиками способно уничтожить только планктонные клетки, не затрагивая прикрепленные формы, которые способны выживать в биоплёнке и размножаться по окончании терапии.

Чаще всего клетки биофильма, взятые отдельно от экзополисахаридного матрикса, не более устойчивы к широкому диапазону антибактериальных препаратов, чем планктонные [5, 12]. Способность антибактериальных препаратов подавлять рост биоплёнки означает, что они могут распространяться через неё и сохранять активность в отношении мишеней, однако при этом клетки биофильма не погибают. В на-

учной литературе активно изучается этот важный для клинического применения феномен [7, 34, 41]. К настоящему времени описан ряд факторов, ответственных за резистентность биоплёнок к антибиотикам [4, 17]. К ним относятся: инактивация антибиотиков внеклеточными полимерами или ферментами; замедление метаболизма микроорганизмов в условиях ограничения питательных веществ в биоплёнке, способствующее быстрой эвакуации антибактериального препарата, экспрессия генов резистентности, формирование персистирующих микроорганизмов.

При использовании антибактериальных препаратов с небольшим размером молекул барьер полисахаридного матрикса может лишь отсрочить гибель клеток, но не предоставляет бактериям полную защиту. Например, фторхинолоны легко диффундируют сквозь биоплёнку и весьма эффективно останавливают ее рост [5]. В то же время описаны биоплёнки, образованные *Pseudomonas aeruginosa*, которые в эксперименте способны замедлять проникновение ципрофлоксацина [30]. Если для поверхности, не покрытой биоплёнкой *Pseudomonas aeruginosa*, этот процесс занимал 40 секунд, то для поверхности, покрытой такой биоплёнкой, требовалось 21 минута [39]. Отсроченное проникновение уменьшает концентрацию антибиотика в биоплёнке и способствует его ферментативной инактивации [29].

Многие из известных способов борьбы с биоплёнками непригодны для применения в медицине, так как могут нанести вред медицинским устройствам или непосредственно организму пострадавшего. S.A. Blenkinsopp et al. [48] показали, что электрические поля низкого напряжения увеличивали эффективность нескольких коммерческих биоцидов при концентрациях существенно более низких, чем для планктонных клеток. A. Zips et al. [33] сообщили, что

обработка ультразвуком удаляет до 95% *Pseudomonas diminuta*, адгезированной на ультрафильтрационной мембране, а С. Т. Huang et al. [41] продемонстрировали эффективность ультразвука против биоплёнки *P. aeruginosa*, адгезированной на стали, более того оказалось, что эта обработка повысила эффективность воздействия гентамицина.

Интересным объектом для воздействия является экзополисахаридный матрикс как немаловажный фактор реализации устойчивости микроорганизмов биопленок к биоцидам. Предлагаются различные способы его удаления. Например, С.Р. Johansen et al. [49] показали, что смесь ферментов была эффективна для подавления жизнедеятельности выращенных *in vitro* биоплёнок. Состав внеклеточного полимерного матрикса биоплёнок может быть весьма вариабельным, однако предлагается идентифицировать полисахариды для определённых организмов в биопленке и воздействовать на биоплёнку ферментами, избирательно разрушающими определённые полисахариды. Так, альгинатная лиаза способствует более эффективной диффузии гентамицина и тобрамицина через альгинатный полисахарид биопленки *P. aeruginosa*. [37, 41]. Ряд других авторов в качестве объекта воздействия рассматривают некоторые специфические для биоплёнок сигнальные молекулы (ацил-гомосериновые лактоны) [44, 46]. Предполагают, что новые виды обработки могли бы базироваться на разрушении этих систем коммуникации между бактериями в биопленках [13, 16], однако конкретных решений пока не найдено.

Используя данные о том, что молодые биоплёнки более восприимчивы к антибактериальным агентам, чем старые, предлагается развивать новые неинвазивные методы диагностики по раннему (доклиническому) обнаружению биоплёнок во внутренней среде. В свою очередь, это даст возможность более эффективно воздейство-

вать на биоплёнки на начальных этапах их формирования. Большое количество лабораторий в настоящее время пытается выявить гены, которые экспрессируются или наоборот репрессируются во время начального формирования биоплёнки [27, 39], что также может служить отправной точкой для появления диагностических тестов или выработки стратегии подавления биоплёнок на генном уровне.

В современной медицине только начинают понимать значение микробных сообществ, организованных в биоплёнки. Очевидно, что бактериальные клетки могут объединяться в специфические дифференцированные трёхмерные структуры, показывая слаженное поведение, что радикально меняет представления, господствовавшие в медицинской микробиологии. Процесс создания реалистичных моделей естественных микробных сообществ в лабораторных условиях и способов его регулирования находится лишь на начальном этапе [7, 16, 34]. На данный момент наиболее перспективными представляются следующие направления борьбы с биоплёнками: предотвращение первичного инфицирования имплантата, минимизация начальной адгезии микробных клеток, разработка методов проникновения биоцидов через матрикс и его разрушение.

В то же время, нельзя считать дальновидной направленность научного поиска исключительно на борьбу с биоплёнками. Не менее важным является более детальное изучение тонких механизмов взаимодействия макроорганизма с колонизирующими его микробными биоплёнками с целью разработки возможных альтернативных подходов в терапии. В перспективе изучение экологических закономерностей возникновения и развития микробных сообществ является ключевым моментом предупреждения хирургической инфекции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин, О. В. Теоретические и прикладные аспекты проблемы персистенции микроорганизмов / О. В. Бухарин // Журн. микробиология. – 2000. – № 4. – С. 4-7.
2. Бухарин, О. В. Фундаментальные и прикладные аспекты проблемы персистенции микроорганизмов / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвяцов, Л. М. Хуснутдинова // Журн. микробиология. – 2003. – №4. – С. 3-8.
3. Габриэлян, Р. И. Функции микрофлоры желудочно-кишечного тракта и последствия её нарушения после хирургических вмешательств / Р. И. Габриэлян, Е. М. Горская, Н. Д. Снегова // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 45 (9). – С. 24-29.
4. Proteom analysis reveals differential protein expression by *Batlus cereus* during biofilm formation / M. C. Oosthuizen [et al.] // *Appl. Environ Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – P. 2770-2780.
5. Изменение антибиотикочувствительности стафилококков в условиях реализации эффекта пептидного антибактериального фактора / В. П. Коробов [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2002. – № 47 (2). – С. 11-15.
6. Мельников, В. Г. Поверхностные структуры грампозитивных бактерий в межклеточном взаимодействии и плёнообразовании / В. Г. Мельников // Журн. микробиология. – 2010. – № 2. – С. 119-123.
7. Сидоренко, С. В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом / С. В. Сидоренко // *Клин. микробиология и антимикроб. химия.* – 2001. – № 4. – С. 301-315.
8. Литвин, В. Ю. Обратимый переход патогенных бактерий в покоящееся (некультивируемое) состояние: экологические и генетические механизмы / В. Ю. Литвин, А. Л. Гинцбург, В. И. Пушкарёва // *Вестн. РАМН.* – 2000. – № 1. – С. 7-13.
9. Бухарин, О. В. Биология патогенных кокков / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвяцов, О. Л. Чернова. – М.: Медицина, 2002. – 107 с.
10. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновного подвидов / Н. А. Видяева [и др.] // *Журн. микробиология.* – 2009. – №5. – С. 13-19.
11. Формирование биоплёнок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик / И. А. Шагинян [и др.] // *Журн. микробиология.* – 2007. – № 1. – С. 3-9.
12. Dong, Y. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl-homoserine lactonase / Y. Dong, L. Wang, J. Xu // *Nature.* – 2001. – Vol. 411. – P. 411; P. 813-817.
13. Haugo, A. J. *Vibrio cholerae* Cyt R is a repressor of biofilm development / A. J. Haugo, P. I. Watnick // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 45. – P. 471-483.
14. Conway, B. A. Biofilm formation and acyl-homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex / B. A. Conway, V. Venu, D. Speert // *Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, N 20. – P. 5678-5685.
15. Donlan, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces / R. M. Donlan // *Emerg. Infect. Diseases.* – 2002. – Vol. 8. – P. 381-390.
16. Miller, M. Quorum sensing in bacteria / M. Miller, B. Bassler // *Annu Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 165-199.
17. Гинцбург, А. Л. “Quorum sensing” или социальное поведение бактерий / А. Л. Гинцбург, Т. С. Ильина, Ю. М. Романова // *Журн. микробиология.* – 2003. – № 5. – С. 86-93.
18. Грузина, В. Д. Коммуникативные сигналы бактерий / В. Д. Грузина // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2003. – Т. 48, № 10. – С. 32-39.
19. Ильина, Т. С. Биоплёнки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // *Генетика.* – 2004. – Т. 40, № 11. – С. 1445-1456.
20. Кузнецов, О. Ю. Бактериальная колония как сложное организованное сообщество клеток / О. Ю. Кузнецов // *Журн. микробиология.* – 2005. – № 2. – С. 3-7.
21. Смирнова, Н. И. Эволюция геномов патогенных холерных вибрионов / Н. И. Смирнова, В. В. Кутырев // *Молекулярная генетика.* – 2004. – № 4. – С. 3-10.
22. Use in-biofilm expression technology to identify genes volved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development / A. Finelli [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – P. 2700-2710.
23. Kolenbrander, P. Communication among oral bacteria / P. Kolenbrander, R. Andersen, D. Blehert // *Microb. Molecular Biology Rev.* – 2002. – Vol. 66, N 3. – P. 486-505.
24. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm / K. Sauer [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 11. – P. 1140-1154.
25. Романова, Ю. М. Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий / Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // *Вестн. РАМН.* – 2000. – № 1. – С. 13-17.
26. Biofilms as complex differentiated communities / P. Stoodley [et al.] // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – Vol. 56. – P. 187-209.
27. Harriott, M. M. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Form Polymicrobial Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance / M. M. Harriott, M. C. Noverr // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* – 2009. – Vol. 53. – P. 3914-3922.
28. Влияние микробных метаболитов на активность каталазы и рост *S. aureus* 6538 p / О. В. Бухарин [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. мед.* – 2000. – № 7. – С. 80-82.
29. O Toole, G. A. Biofilm formation as microbial

- development / G. A. O Toole, H. Kaplan, R. Kolter // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. – Vol. 54. – P. 49-79.
30. Davey, M. E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M. E. Davey, G. A. O Toole // *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* – 2000. – Vol. 64. – P. 847-867.
31. Donlan, R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002. – Vol. 15. – P. 167-193.
32. Mylonakis, E. The *Enterococcus faecalis* *fsr B* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model / E. Mylonakis, M. Engelbert, X. Qin // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70, N 8. – P. 4678-4681.
33. Zips, A. G. Ultrasound as a means of detaching biofilms / A. G. Zips, A. A. Schaule, H. C. Flemming // *Biofouling.* – 1990. – Vol. 2. – P. 323-333.
34. Kato, J. Control by A-factor of a metalloendopeptidase gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* / J. Kato, A. Suzuki, H. Yamazaki // *Ibid.* – 2002. – Vol. 184, N 21. – P. 6016-6025.
35. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csd D* gene / C. Prigent-Comharet [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183. – P. 7213-7223.
36. Parkins, M. D. *Pseudomonas aeruginosa* Gac A, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation / M. D. Parkins, H. Ceri, D. G Storey // *Mol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 40. – P. 1215-1226.
37. O Toole, G. A. The glob carbon metabolism regulator *Crc* is a component of signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* / G. A. OToole, A. K. Gibbs, P. W. Hager // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 425-431.
38. Chatterjee, A. Rsm A and the quorum-sensing signal, N-[3-oxohexanoyl]-L-homoserine lactone, control the levels of rsm B RNA in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by affecting its stability / A Chatterjee, Y. Cui, A. K. Chatterjee // *J. Bacteriol.* – 2002 – Vol. 184, N 15. – P. 4089-4095.
39. Duan, K. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication / K Duan // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 50. – P. 1477-1491.
40. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule / J. Byers [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, N 4. – P. 1163-1171.
41. Effects of ultrasonic treatment on the efficacy of gentamicin against established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / C. T. Huang // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 1996. – Vol. 6. – P. 235-242.
42. Прозоров, А. А. Феромоны компетентности у бактерий / А. А. Прозоров // *Микробиология.* – 2001. – Т. 70, № 1. – С. 5-14.
43. O Toole, G. A. To build a biofilm / G. A. O Toole // *J. Bacteriol.* 2003. – Vol. 185. – P. 2687-2689.
44. Conlon, K. M. IcaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermis* / K. M. Conlon // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – P. 4400-4408.
45. A quorum sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus* mutants is involved in biofilm formation / Y. H. Li [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – P. 2699-2708.
46. АНА, an enzyme that inactivates the acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* / Y. Dong [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 97, N 7. – P. 3526-3531.
47. Davey, M. E. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* II / M. E. Davey, N. C. Caiazza, G. A. O Toole // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – P. 1027-1036.
48. Blenkinsopp, S. A. Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / S. A. Blenkinsopp, A. E. Khoury, J. W. Costerton // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – Vol. 58. – P. 3770-3773.
49. Johansen, C.P. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms / C. P. Johansen, P. Falholt, L. Gram // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – P. 3724-3728.
50. Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms / P. K. Singh [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – P. 762-764.

#### Адрес для корреспонденции

660022, Российская Федерация,  
г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1,  
Медицинский университет,  
кафедра общей хирургии,  
тел. раб.: +7 (391) 222-97-40,  
тел. моб.: +7 913 532-84-86,  
e-mail: yuvinnik@yandex.ru,  
Винник Ю.С.

Поступила 29.10.2010 г.