

УДК 579.262: 574. 3: 616.9

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ И ИНФЕКЦИИ (ЛЕКЦИЯ)

Чернявский В. И.

Харьковская медицинская академия последипломного образования

На протяжении всей истории вплоть до конца прошлого века микробиология развивалась, главным образом, на основе исследований чистых культур микроорганизмов. Этот традиционный путь, сложившийся на общепринятых представлениях о том, что в природных условиях бактерии существуют как свободно плавающие (планктонные) клетки, позволил получить сведения об основных жизненно важных процессах, происходящих в микробных клетках.

Другими словами, все наши знания о морфологии, физиологии, генетике, адаптационных возможностях бактерий были получены при изучении планктонных форм бактерий. В настоящее время известно, что более 99% бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих клеток, а в виде прикрепленных к субстрату биопленок (Biofilms). Некоторые исследователи считают, что планктонную форму можно рассматривать лишь как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой, то есть как кратковременное состояние в жизни бактерий. Более того, ни для одного вида бактерий не описано существование только в планктонном состоянии при всех возможных условиях роста.

Тот факт, что бактерии способны образовывать сложные бактериальные сообщества, играющие важную роль в природе, был известен давно, однако феномен коллективного поведения бактерий был описан, по разным источникам, в 1992-1994 годах (рис. 1).



Рис. 1. Биопленка или коллективное сообщество микроорганизмов.

Образование биопленок и их функционирование – пример сложного социального поведения бактерий, регулируемого и управляемого не только сигналами из окружающей среды, но и межклеточными связями. В настоящее время явление межклеточного общения бактерий, получившего название “quorum sensing” – QS (чувство кворума), расшифровано и описано.

Этот тип межклеточного общения и образование биопленок играет ключевую роль во взаимоотношении бактерий с живыми организмами и растениями. Преимущество коллективного поведения бактерий определяется глубокими изменениями в метаболизме бактериальных клеток при достижении ими определенной критической плотности. Впервые это было показано при изучении биолюминесценции у обитающих в морской воде бактерий *Vibrio fischeri*. Оказалось, что эффект биолюминесценции наблюдается только при высокой плотности культуры, но может быть индуцирован и у культур с низкой плотностью, при условии их контакта с безмикробной культуральной жидкостью в которой выращивали биолюминесцирующие бактерии. В дальнейшем оказалось, что свечение бактерий обусловлено продуктами генов биолюминесценции и контролируется этот процесс сиг-

нальными молекулами, продуцируемыми самими бактериями и работающими по принципу аутоиндукторов (АИ). Биолюминесценция регистрируется при накоплении в культуре молекул АИ только при высокой плотности бактерий ($>10^7$ КОЕ/мл).

Зависимая от плотности клеточной популяции аутоиндукция специфических генов осуществляется при помощи двух регуляторных белков:

1. белка Lux I, участвующего в биосинтезе сигнальных молекул АИ, и
2. белка LuxR, способный связываться с молекулами АИ и активировать транскрипцию оперонов и генов.

По этому же типу (QS) регулируется широкий спектр физиологических процессов, включая синтез детерминант вирулентности у патогенных бактерий, перенос конъюгативных плазмид, образование биопленок.

В настоящее время считается общепринятым представление о том, что развитие биопленочных сообществ – одна из основных стратегий выживания микроорганизмов не только в окружающей среде, но и в организме человека и животных. В природе биопленки распространены повсеместно и рассматриваются как высокоорганизованное сообщество, образованное бактериями одного или

нескольких видов и состоящих как из активно функционирующих клеток, так и из некультивируемых форм. Ключевым структурным компонентом биопленок является внеклеточное полимерное вещество (матрикс), в то время, как сами бактерии составляют лишь 5-35 % массы биопленок.

Матрикс представляет собой смесь таких компонентов, как липополисахариды, гликопротеиды, протеогликаны, нуклеиновые кислоты и другие вещества, анало-

гичные по составу клеточным стенкам бактерий. Матрикс пронизан каналами, по которым циркулируют питательные вещества, ферменты, продукты жизнедеятельности, кислород.

Началом развития биопленок является прикрепление бактерий к биотической или абиотической поверхности, и в этом переходе к биопленочному образу жизни большая роль принадлежит поверхностным органеллам – пилиям (рис. 2).

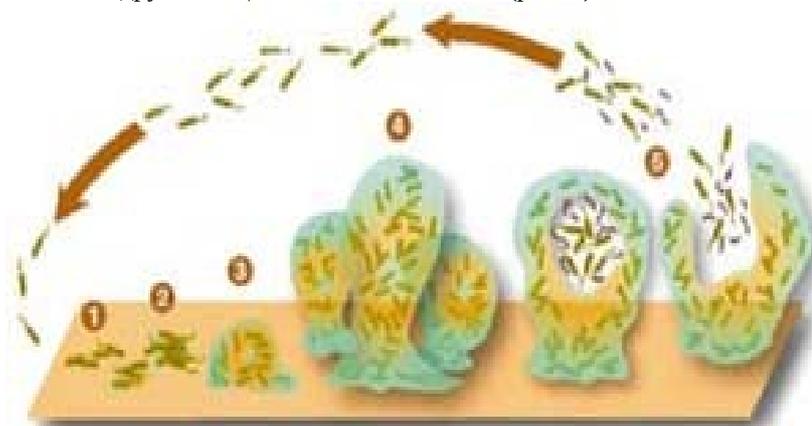


Рис. 2. Жизненный цикл биопленки: 1 – прикрепление бактерии к поверхности; 2-4 – рост колонии и продукция межклеточного матрикса, формирование биопленки; 5 – выход свободных бактерий из колонии.

Чаще всего именно они определяют взаимодействие с различными поверхностями. Например, колонизация кишечника холерными вибрионами определяется Тср-пилями, а прикрепление к абиотическим поверхностям – пилиями, кодируемые локусом *msh*, не относящиеся к факторам патогенности. Следует подчеркнуть также, что процесс перехода бактерий от планктонного существования к биопленочному инициируется сигналами, поступающими из окружающей среды, причем эти сигналы могут существенно отличаться не только для разных видов бактерий, но и штаммов. Например, штамм *E.coli* 0157:H7 образует биопленки только при недостатке питательных веществ, штаммы *E.coli* K12 способны образовывать биопленки только при добавлении в минимальную питательную среду аминокислот.

Во время начального прикрепления планктонные бактерии контактируют с субстратом и фиксируются, но

эта фиксация обратима. Следующая стадия образования биопленок подразделяется на две – стадия созревания 1, во время которой клетки теряют подвижность, прикрепление становится необратимым, образуются микроколонии и слой биопленки утолщается. На следующем этапе – стадия созревания 2 образуются кластеры микроколоний, достигающих максимальной плотности. Через 9 дней после начала образования биопленки структура кластеров изменяется и начинается последняя стадия – процесс дисперсии (распада), во время которого бактерии способны активно покидать биопленку. Распад матрикса происходит под влиянием ферментов (например, полисахаридлиаз), секретируемых бактериями и активации функции подвижности. Цикл развития биопленки завершается тем, что бактерии выплывают через открытые каналы и вновь возвращаются к планктонному образу жизни (рис. 3).



Рис. 3. Биопленка *S.epidermidis* с клапана сердца при инфекционном эндокардите.

Прогресс в изучении феномена биопленок связан с совершенствованием техники микроскопирования и, в первую очередь, с применением конфокального

сканирующего лазерного микроскопа и атомно-силового микроскопа, но механизмы образования биопленок до настоящего времени во многом не ясны.

В частности, считается, что феномен коллективного поведения бактерий обеспечивается различными олигопептидными сигнальными молекулами, при помощи которых клетки приобретают способность контактировать друг с другом и образовывать биопленки. Например, у грамположительных бактерий механизм образования биопленки представлен следующим образом: вначале синтезируется предшественник сигнального пептида, который затем модифицируется, превращаясь в сигнальный олигопептид. Этот пептид транспортируется из клетки при помощи белкового комплекса (ABC-транспортера) в межклеточное пространство. При достижении определенного уровня внеклеточной концентрации пептида фермент гистидинкиназа (фермент, передающий фосфатные группы другим молекулам сигнальной системы) объединяется с ним, и образовавшийся комплекс гистидинкиназа-пептид инициирует процесс каскадного фосфорилирования. Этот процесс приводит к формированию коммуникативных реакций у бактерий, их объединению и образованию биопленки. Одна из концепций, объясняющая механизм образования биопленок предложена в 2009 году профессором Т. Вуд (Thomas K. Wood) с сотрудниками из отдела химической инженерии Техасского университета. Было показано, что бактерии, в частности *E.coli*, способны препятствовать размножению фагов. Когда фаг «захватывается», бактерии включают ДНК фага в свои хромосомы. Этот новый генетический материал позволяет бактериям не только выжить, но и быть более жизнеспособными, по сравнению со сходными бактериями, не включившими ДНК фагов. Эти данные позволили предположить, что образование биопленок базируется на вирусных (фаговых) генах. Более того, авторы описали механизм этого процесса. Оказалось, что у бактерий есть белок – Hha, способный контролировать сохранение вирусных генов в бактериях. Когда Hha «включен» бактерии избавляются от вирусных генов, становятся высоко подвижными и не способны образовывать биопленки. Когда Hha не активирован, бактерии теряют подвижность и образуют биопленки с большой скоростью. Другими словами, по мнению авторов, найден регулятор (Hha), контролирующий гены, ответственные за формирование биопленок.

Дальнейшее изучение механизмов формирования биопленки и ее функций открывает новые возможности для лечения и профилактики целого ряда заболеваний. В настоящее время показана роль и значение микробных биопленок в этиологии и патогенезе многих острых и, особенно, хронических бактериальных инфекций человека. К числу таких заболеваний относятся инфекции мочевых путей (*E.coli* и др.), инфекции среднего уха (*H.influenzae*), муковисцидоз, кистозный фиброз (*P.aeruginosa*), инфекционный эндокардит, инфекции протезированных клапанов, катетер-ассоциированные инфекции кровотока (коагулазоположительные и коагулазоотрицательные стафилококки, грибы рода *Candida*) и стоматологические проблемы (кариес, парадонтит, гингивит). Исходя из опубликованных данных, частота инфекций, обусловленных биопленкой, составляет 65-80 %. Более того, по некоторым данным, свыше 60 % внутрибольничных инфекций связаны с микроорганизмами, находящимися в биопленках.

В настоящее время доказано участие биопленок в контаминации медицинских имплантатов. Чаще всего

биопленки формируются на катетерах (сердечных, внутривенных, мочевыводящих), искусственных клапанах сердца (являясь основной причиной инфекционных эндокардитов), искусственных суставах, контактных линзах (часто являясь причиной кератитов). Видовой состав биопленок в значительной части случаев представлен: *S.aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *E.coli*. Кроме того, многие патогенны, такие как *Salmonella*, *E.coli*, *Y.enterocolitica*, *Listeria*, *Campylobacter*, существуют в виде биопленок на поверхности пищевых продуктов или на поверхности оборудования для их хранения.

В последнее десятилетие произошло значительное расширение возможности изучения формирования микробных биопленок. Основное направление этих исследований связано с разработкой методов культивирования микроорганизмов в динамических (имитация естественных условий образования биопленок) и статических условиях. Суть динамических методов заключается в инокулировании бактерий в планктонной форме в жидкие питательные среды, циркулирующие в закрытой системе (лабораторные ферменторы). Среди этих методов наиболее известным является культивирование микроорганизмов в аппарате Робинсона. Этот аппарат обеспечивает постоянный ток питательной среды, которая соприкасается с пластинами на поверхности которых находятся адгезированные микробные клетки. В условиях постоянного доступа питательных веществ и аэрации образуется биопленка.

Примером статического метода изучения образования биопленок является культивирование микроорганизмов в 96-луночных пластиковых планшетах. Суть метода состоит в следующем: суспензию бактерий вносят в лунки планшета и после инкубации в оптимальных условиях планктонная фаза популяции бактерий удаляется вместе с питательной средой, а образовавшуюся биопленку выявляют различными методами. Например, к методам, которые визуализируют структуру микробных сообществ и позволяют идентифицировать микроорганизмы в составе биопленок, следует отнести электронную микроскопию, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию, метод флуоресцентной гибридизации *in situ* и др. Однако следует подчеркнуть, что все выше перечисленные методы применяются в настоящее время только для научных исследований и не адаптированы для использования в практической диагностической работе. В зарубежной практике разработаны и стандартизованы методы выявления биопленок лишь для небольшого числа клинически значимых видов микроорганизмов.

Но главная проблема состоит в том, что лечение инфекций, ассоциированных с биопленками, представляет значительные трудности. В первую очередь это касается хронических инфекций. Повысить эффективность их лечения можно, по-видимому, лишь отказавшись от традиционной антибиотикотерапии. Связано это с тем, что в составе биопленок бактерии приобретают качественно новые свойства по сравнению с микроорганизмами в планктонной форме. Это касается, в первую очередь, способности биопленочных бактерий защищаться от стрессовых воздействий, включая устойчивость к антибиотикам, дезинфектантам и эффекторам (гуморальным и клеточным) иммунной системы человека.

Резистентность биопленочных бактерий к перечисленным стрессовым воздействиям обусловлена рядом факторов:

1. снижением возможности проникновения антибактериальных препаратов внутрь биопленки. Это связано с тем, что матрикс биопленки, которым окружены бактериальные клетки, может связывать или не пропускать, и/или инактивировать антибиотики. Например, аминогликозидные антибиотики медленно проникают в биопленки, образуемые псевдомонадами, так как связываются полисахаридными компонентами матрикса. Установлено, что в биопленки, образованные *K.pneumoniae*, плохо проникает ампициллин, а образованные *E.faecalis* – ампициллин, ко-тримаксозол, ванкомицин. Полисахаридный матрикс, образованный *S.aureus* и *S.epidermidis*, снижает антибактериальный эффект гликопептидов (ванкомицина и тейкопланина) и β -лактамов (оксациллина и цефотаксима). Инактивация антибиотиков продемонстрирована на примере биопленочных бактерий *P.aeruginosa*, обладающих повышенной способностью продуцировать β -лактомазы;

2. различиями в метаболической активности бактериальных клеток, образующих биопленки. Оказалось, что на периферии биопленок находятся метаболически активные клетки, а внутри – метаболически неактивные. Поскольку известно, что мишенями действия антибиотиков являются активно растущие клетки, то клетки находящиеся внутри биопленок оказываются защищенными от воздействия антибиотиков;

Таблица.- Результаты сравнительного изучения антибиотикорезистентности планктонных и биопленочных бактерий

Микроорганизмы	Антибиотик	В жидкой среде, МИК, мкг/мл	Биопленка, МИК, мкг/мл
<i>S. aureus</i>	Ванкомицин	2	20
<i>E. coli</i>	Ампициллин	2	512
<i>P. pseudomallei</i>	Цефтазидин	8	800
<i>S. sanguis</i>	Доксициклин	0,063	3, 15

Особый интерес представляет антибиотикорезистентность полимикробных биопленок не только потому, что изоляты различных видов бактерий, образующих биопленку несут различное сочетание генов резистентности, но и потому, что способны передавать эти гены друг другу в условиях тесного контакта внутри биопленки. Например, показана возможность передачи генов устойчивости к ванкомицину (*van A*) и тетрациклину (*tet S*, *tetU*) от *E.faecium* к *S.aureus*.

Современные представления о роли биопленок в этиопатогенезе острых и особенно хронических инфекционных заболеваниях требуют совершенно новых подходов к их диагностике и лечению. Становится очевидным, что для повышения эффективности лечения инфекций, ассоциированных с биопленками, необходимо определять не только антибактериальные характеристики антибиотиков, но и их способность препятствовать адгезии бактерий, проникать в биопленки, подавлять их образование или способствовать дезорганизации внеклеточного матрикса.

В настоящее время известен ряд антибактериальных средств, которые в той или иной мере отвечают вышеперечисленным свойствам. Например, использование мупироцина при хроническом риносинусите приводит к разрушению биопленки, образованную метициллинрезистентными стафилококками, у 97,5% пациентов, а N-аце-

тилцистеин разрушает структуру внеклеточного матрикса, образованного *P.aeruginosa* и ингибирует продукцию слизи *S.epidermidis*. Эффективность азитромицина у пациентов с муковисцидозом связана с его способностью нарушать образование биопленки штаммами *P.aeruginosa*, а субингибирующие дозы этого антибиотика препятствуют образованию биопленки *H.influenzae*. Известно также, что липосомальный комплекс амфотерицина В обладает выраженной активностью по отношению к биопленкам, образуемым *Candida spp*.

Таким образом, становится очевидным, что современные представления о роли биопленочных бактерий в инфекционной патологии человека предполагают изменение подходов к лечению заболеваний, ассоциированных с биопленками, поскольку традиционная антибиотикотерапия не позволяет решить эту проблему.

3. уменьшением свободной поверхности бактерий за счет контактов друг с другом, формированием популяций микробных клеток, оставшихся жизнеспособными после воздействия антибиотиков и способных к персистенции. Эти клетки, получившие название персисторы, оказались устойчивы практически ко всем антибактериальным препаратам. Количество персисторов в биопленках разного происхождения варьирует от 1 до 10 %.

Известны также генетические факторы, ответственные за уровень устойчивости биопленочных бактерий к стрессовым факторам. Например, ген *ndvB* экспрессируется только биопленочными клетками *P.aeruginosa*, а мутации в этом гене делают биопленку на порядок чувствительнее к антибиотикам по сравнению с дикими штаммами. Возможность образования биопленки *B.subtilis* определяет белок *DegU*, а белок *SasG*, располагающийся на поверхности *S.aureus*, вместе с ионами цинка, необходим для построения биопленки. Белок *CagD* *E.coli* активирует рост фимбрий и синтез внеклеточных полисахаридов, способствуя образованию биопленок.

Выше перечисленные механизмы резистентности биопленочных бактерий к антибактериальным средствам позволяют им сохранить жизнеспособность при концентрации антибиотиков в десятки и сотни раз выше терапевтических доз, подавляющих планктонные формы. В таблице приведены данные, полученные при сравнительном изучении антибиотикорезистентности планктонных и биопленочных бактерий (А.С. Лабинская с соав.).

Таким образом, становится очевидным, что современные представления о роли биопленочных бактерий в инфекционной патологии человека предполагают изменение подходов к лечению заболеваний, ассоциированных с биопленками, поскольку традиционная антибиотикотерапия не позволяет решить эту проблему.

References

1. Breidenstein E.B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: role roads lead to resistans. *Trends Microbiol.* - 2011,-v.19,-p.419-426.
2. Chebotar I.V. et al. Antimicrobial Resistance of Bacteria in Biofilms. *Clinical Microbiology and antimicrobial chemotherapy.*-2012,-v.14,-p.51-58.
3. Costerton J.M. et al. Bacteril biofilms: a common cause persistens infection. *Science.* -1999,-v.284,-p.1318-1322.

4. Donlan R.M. et al. Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganism. Clin.Microbiol.Rev. 2002,-v.15,-p.167-193
5. Golub A.V. Bacterial Biofilms – a New Therapeutic Target? Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy. 2012,-v.14,-N.1.-p.23-29
6. Hall- Stoodley L. et al. Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microbiol. 2009,-v.11,-p.1034-1043.
7. Jakobsen T.H. et al. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition in vitro. Quorum sensing: methods and protocols. Methods in Molecular Biology. 2011.-v.692.-p.253-263.
8. Singh R.et al. Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. J.Antimicrob.Chemother. 2010.- v.65.-p.1955-1958.
9. Shan K.D. et al. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in Escherichia coli. J. Bacteriol. 2004.-v.186.-p.8172-8180.
10. Tetz V.V. et al. Extracellular phospholipids of isolated bacterial communities. Biofilms.2004.-v.1.p.149-155.
11. Nenke P. et al. The role of biofilm infection in urology. World Journal of Urology. 2006.-v.24.-p.13-20.

UDC 579.262:574.3:616.9

BACTERIAL BIOFILMS AND INFECTION (LECTURE)

Chernjavsky V.I.

The lecture presents published data on the biofilm – a special form of organization of the microflora of the human body, the role of microbial biofilms in the genesis and development of many common diseases. Different mechanisms of antimicrobial resistance development in biofilm are reviewed in the article.

Key words: bacterial biofilms, extracellular matrix, dynamic and static methods, antimicrobial resistance