

## ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЁНОК НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ. ВОЗМОЖНОСТЬ ИЗУЧЕНИЯ БИОПЛЁНОК НА ЖЕЛЧНЫХ КОНКРЕМЕНТАХ

Винник Ю. С., Серова Е. В., Андреев Р. И., Перьянова О. В., Рукосуева Т. В.,  
Лейман А. В., Мичуров Е. И.

*ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого»  
Минздрава РФ, Красноярск, Россия (660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1), e-mail:  
ekaterina\_s\_07@mail.ru*

На сегодняшний день общепризнанным является тот факт, что основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества – биоплёнки, представляющие собой высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества, состоящие как из активно функционирующих клеток, так из покоящихся форм, заключенных в экзополимерный матрикс, а не отдельные планктонные клетки. В последнее время в отечественной и зарубежной литературе появился ряд работ, освещающих микробиологический аспект проблем желчнокаменной болезни, острого и хронического калькулезного холецистита, доказывающих важную роль микроорганизмов в развитии заболеваний билиарного тракта и образовании конкрементов. Однако роль биоплёнок микроорганизмов в развитии острого и хронического воспаления, антибиотикорезистентности некоторых штаммов при наличии конкрементов в желчном пузыре остаётся недостаточно изученной.

Ключевые слова: микробные биоплёнки, желчнокаменная болезнь.

## FEATURES OF THE FORMATION OF MICROBIAL BIOFILMS ON VARIOUS SUBSTRATES. THE POSSIBILITY OF STUDYING BIOFILMS ON GALLSTONES

Vinnik Y. S., Serova E. V., Andreev R. I., Peryanova O. V., Rukosueva T. V.,  
Leyman A. V., Michurov E. I.

*SBEI HPE «Krasnoyarsk State Medical University them. prof. V. F. Voyno-Yasenetsky» of the Ministry of Health of the Russian Federation*

To date, it is an accepted fact that the basic form of existence of bacteria in vivo are associated with the surface of the community – biofilms, which are highly organized, flexible, continuously changing heterogeneous community, consisting of both active functioning cells, because of the dormant forms enclosed in ekzopolimerny matrix, rather than individual planktonic cells. In the latest in domestic and foreign literature while a number of papers covering the microbiological aspect of the problems of gallstone disease, acute and chronic calculous cholecystitis, proving the important role of microorganisms in the development of diseases of the biliary tract and the formation of stones. However, the role of microorganisms in the biofilm development of acute and chronic inflammation, some strains of antibiotic resistance in the presence of stones in the gall bladder remains understudied.

Keywords: wordmicrobial biofilms, cholelithiasis.

В настоящее время общепризнано, что основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества – биоплёнки, а не отдельные планктонные клетки [1, 3]. На сегодняшний день предполагается, что 90 % изученных видов таксономического домена *Bacteria* способны формировать биоплёнки [3, 16].

В последнее время появился ряд работ, освещающих микробиологический аспект проблем ЖКБ, доказывающих важную роль микроорганизмов в развитии заболеваний билиарного тракта и образовании конкрементов [4, 5, 8, 9, 10, 12]. Однако роль биоплёнок

микроорганизмов в развитии острого и хронического воспаления при наличии конкрементов в желчном пузыре остаётся недостаточно изученной.

Биоплёнки – это высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества, состоящие как из активно функционирующих клеток, так из покоящихся форм, заключенных в экзополимерный матрикс [1, 6, 16]. Они могут состоять из одного [1] или, что встречается более часто, из нескольких видов микроорганизмов [6, 7]. Ранее считалось, что биоплёнки образуются только на изделиях медицинского назначения, таких как катетеры, эндотрахеальные трубки, внутриматочные спирали, контактные линзы [2, 14, 18]. В настоящее время установлено, что биоплёнки являются основными факторами патогенеза заболеваний, характеризующихся хроническим воспалением [1, 11]. Их обнаруживают более чем в 80 % хронических инфекционных и воспалительных заболеваний, что позволило выдвинуть концепцию хронических болезней как болезней биоплёнок [2, 3].

Образование биоплёнок – это сложный комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов: адгезии клеток на поверхности и перераспределения клеточной массы; активного деления клеток для создания клеточных кластеров; образования экзополимерного слизистого матрикса. Изначальное прикрепление микробной клетки к поверхности субстрата осуществляется за счёт действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван дер Ваальса, неспецифической адгезии. Адгезия к биологическим поверхностям обуславливается специфическим взаимодействием белков-адгезинов или лектинов фимбрий экзоплазматического компартмента бактериальной клетки с рецепторами или определенными доменами поверхности мембран клеток-мишеней. Механизм адгезии грамположительных бактерий отличается от механизма адгезии грамотрицательных. Так, например, важнейшим элементом в процессе адгезии стафилококков является полисахарид (Polysaccharide Intercellular Adhesin – PIA), который участвует как в клеточной субстратной адгезии, так и в последующем формировании клеточных кластеров. У грамотрицательных микроорганизмов важную роль в адгезии и клеточной агрегации играют жгутики и фимбрии IV типа. Движение, обусловленное жгутиками, способствует распространению и образованию клеточного монослоя на субстрате, а фимбрии IV типа участвуют в клеточной агрегации за счёт лектинового взаимодействия [3]. По мере размножения бактерий они более прочно прилипают к поверхности, дифференцируются, обмениваются генами, что обеспечивает их выживаемость.

Процесс формирования биопленки можно разделить на три этапа.

1. Обратимое прикрепление к поверхности. Чаще всего микроорганизмы существуют в виде свободно плавающих масс или единичных (например, планктонных) колоний. Однако в

нормальных условиях большинство микроорганизмов стремится прикрепиться к поверхности и, в конечном счете, образовать биопленку.

2. Перманентное прилипание к поверхности. По мере размножения бактерий они более прочно прилипают к поверхности, дифференцируются, обмениваются генами, что обеспечивает их выживаемость.

3. Формирование слизистого защитного матрикса/биопленки. Однажды устойчиво присоединившись, бактерии начинают образовывать экзополисахаридный окружающий матрикс, известный как внеклеточное полимерное вещество (extracellular polymeric substance). Это предохранительный матрикс или «слизь» (EPS-matrix). Мелкие колонии бактерий затем образуют первоначальную биопленку [1, 14].

Экспериментальные лабораторные исследования показали, что планктонные бактерии, например, стафилококки, стрептококки, псевдомонады, кишечная палочка обычно присоединяются друг к другу в течение нескольких минут; образуют прочно соединенные микроколонии в течение 2–4 часов; вырабатывают внеклеточные полисахариды и становятся значительно более толерантными к биоцидам, например, к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам в течение 6–12 часов; вовлекаются в зрелые колонии биопленки, которые очень устойчивы к биоцидам и теряют планктонные бактерии в течение 2–4 дней в зависимости от видов бактерий и условий роста; быстро восстанавливаются после механического разрушения и вновь формируют зрелую биопленку в течение 24 часов [1].

После необратимой адгезии популяция микроорганизма начинает интенсивно пролиферировать с образованием многоклеточных слоёв и синтезировать компоненты экзополимерного матрикса (Extracellular Polymeric Substance); это один из ключевых моментов образования биопленок [1, 3, 14, 17]. Применение лазерной конфокальной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии, позволило установить, что биопленки имеют сложную трёхмерную структурную организацию. Состав матричной слизи варьирует в зависимости от микроорганизмов в нём присутствующих и включает полисахариды, белки, гликолипиды и бактериальную ДНК [15]. При этом основным компонентом являются полисахариды (декстран, гиалуроновая кислота, целлюлоза и другие). По данным разных авторов эта фракция составляет от 40 до 95 % от общей массы биопленки; содержание других химических веществ значительно варьирует и зависит от таксономической единицы бактерии, образующей биопленку [19, 20].

Доля белков в биопленке может составлять до 60 %, липидов до 40 % и нуклеиновых кислот 1–20 % [3, 13]. Порядка 80–90 % объёма биопленок занимает вода, поэтому все её составляющие находятся в гидротированном состоянии. Матрикс биопленки разделён каналами, наполненными водой, а также имеет полости. Через каналы транспортируются

питательные вещества и проходят конвективные потоки кислорода от внешних к внутренним частям биоплёнки, одновременно с этим выводятся метаболиты бактериальных клеток [3].

Формирование, рост, миграция планктонных форм клеток для колонизации в биопленках регулируются на уровне популяции посредством механизмов межклеточной коммуникации. «Quorum sensing» (QS) – это процесс коллективной координации экспрессии генов в популяции бактерий, опосредующий специфическое поведение клеток. Механизм работы QS основан на сложной иерархической регуляции целевых локусов генома бактериальной клетки. При этом регуляция осуществляется на разных уровнях воздействия: транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном. На конкретный клеточный сигнал клетки в популяции отвечают специфическим ответом. На сегодняшний день установлено, что клеточно-клеточные взаимосвязи влияют на внутривидовую дифференцировку клеток, на экспрессию генов вирулентности, регулируют ростовые процессы, характер и направление подвижности (таксис), а также бактериальный апоптоз и токсинообразование. Работу QS можно сравнить с гормональной регуляцией функциональной активности различных органов и тканей в многоклеточном организме. Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы используют различные сигнальные системы и разные химические передатчики сигналов [3, 21].

Из многочисленных свойств биопленки клиническое значение имеют высокая устойчивость к факторам естественной резистентности организма, к разнообразным внешним воздействиям, к антибактериальным средствам [1, 6, 7].

Значительная резистентность к антибиотикам микроорганизмов в составе биоплёнок по сравнению с планктонными формами обусловлена способностью бактерий накапливать в матриксе внеклеточные ферменты, разрушающие антибиотики, и агрегационной природой биоплёнок, связанной с уменьшением площади открытой поверхности клеток, что приводит к физической недоступности молекул. Также особую роль играет резистентный фенотип клеток и сниженный метаболизм микроорганизмов в биоплёнке, который достигается за счёт их многослойной топографии и приводит к снижению антибиотикочувствительности. Строение биоплёнок идеально способствует процессам обмена генетической информацией, в том числе резистентности к антимикробным химиопрепаратам, за счёт тесного контакта и стабильной пространственной локализацией клеток. Исследования *in vitro* показывают, что уровень конъюгации в биоплёнках гораздо выше, по сравнению с планктонными формами бактерий. Более того, процессы конъюгации могут регулироваться на популяционном уровне за счет бактериальной коммуникации, например, вирулентные энтерококки для передачи генетической информации используют сигнальные системы [1, 3].

Особый интерес представляют собой клетки-персистеры – альтруистические интактные клетки, способные выживать даже при высоких дозах антибиотиков, летальных для остальных микробных клеток. По данным некоторых авторов их количество варьирует от 1 до 5 % от всей популяции. Они метаболически неактивны, а их основное назначение, по-видимому, депонирование и сохранение генетического материала для последующего восстановления популяции. Фенотип персистеров характеризуется интересной биологией, они замедляют все физиологические процессы и становятся толерантными к действию разных факторов, в том числе и к воздействию антимикробных препаратов [3]. Свойство антибиотикотолерантности отличается от механизмов резистентности [3, 20].

Действие всех механизмов устойчивости бактерий, по существу, можно свести к одному явлению – это предотвращение взаимодействия антибиотика с его мишенью (за счет изменений самих мишеней, или с помощью синтеза ферментов, нейтрализующих антибиотики). Толерантность же опосредуется способностью микробной клетки выживать в присутствии антибиотика за счет замедления метаболизма и «выключения» основных биологических процессов клетки. Антибиотики эффективно проявляют свое действие в отношении интенсивно делящихся клеток с высоким уровнем синтетических процессов. А когда клетка находится в стадии физиологического покоя («клеточного анабиоза»), антибактериальное средство не способно проявить в полной мере свою биохимическую функцию. Например, эритромицин ингибирует биосинтез белка, этим проявляется его бактериостатический эффект (клетка не растет, не размножается, метаболизм замедляется). Но клетка не погибает непосредственно от действия препарата. Стрептомицин, аминогликозиды, фторхинолоны нарушают процессы трансляции, репликации. «Выключая» на время работу рибосом, клеткаперсистер будет проявлять толерантность к аминогликозидам, макролидам. Так как персистеры не растут, не делятся, хромосома и белковые системы репликации, репарации, транскрипции находятся в интактном состоянии, то действие фторхинолонов не проявится. Следствием вышеуказанных «выключений» биологических функций клетки является и прекращение синтеза пептидогликана, останавливается построение клеточной стенки, в связи с этим,  $\beta$ -лактамы антибиотики также будут не эффективны. Белки персистеров выключают работу, функцию всех мишеней антибиотиков, опосредуя тем самым мультитолерантность (MDT, multi-drug tolerance). Следовательно, бактерицидные антибиотики в отношении персистеров будут оказывать только бактериостатический эффект [3, 13, 23].

Это возможно благодаря так называемым токсин-антитоксин модулям (ТА), которые экспрессируют токсины и антитоксины, находящиеся в цитоплазме клеток. При возникновении неблагоприятных факторов происходит синтез токсина, блокирующего

процессы трансляции, при восстановлении комфортных для жизнедеятельности условий, происходит выработка антитоксина, связывающего токсин. Следствием этого является связывание токсина в протеиновый комплекс и нормализация метаболических процессов клетки. Бактерии начинают пролиферировать, возобновляется бактериальная коммуникация, восстанавливается материнская популяция, что для макроорганизма характеризуется хронизацией инфекции [3].

Таким образом, на сегодняшний день существует достаточно фундаментальных сведений о процессах формирования и жизнедеятельности биоплёнок, изучено образование микробных сообществ на изделиях медицинского назначения. Однако в литературе недостаточно информации о развитии биоплёнок в различных биотопах макроорганизма, в том числе на желчных конкрементах, в то время, как их роль в развитии хронического и острого воспаления в гепатобилиарной системе, антибиотикорезистентности некоторых штаммов несомненна.

### Список литературы

1. Афиногенова А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3(61). – С. 119-125.
2. Влияние бигуанидов на формирование стрептококковой биопленки на модели культуры клеток фибробластов кожи эмбриона человека / А. Г. Афиногенова, К. Б. Грабовская, Е. В. Кулешевич и др. // Инфекции в хирургии. – 2011. – № 1. – С. 3-11.
3. Гостев В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 4-15.
4. Ермолов А. С. Хирургия желчнокаменной болезни / А. С. Ермолов // Анналы хирургии. – 1998. – № 3. – С. 13-24.
5. Зубарева Н. А. О возможном механизме инфицирования желчных путей при холелитиазе / Н. А. Зубарева, П. Я. Сандаков, Т. И. Карпунина // Анналы хирургии. – 1998. – № 1. – С. 55-57.
6. Изучение процесса образования биопленки патогенными микроорганизмами на поверхности почечных камней / Э. Р. Толордава, Т. С. Перепанова, Д. К. Егамбердиев, Ю. М. Романова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 9. – С. 31-32.
7. Ильина Т. С. Биопленки 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. – № 40. – С. 1–12.

8. Микробиологические аспекты хирургической патологии билиарной системы / В. А. Черкасов, Н. А. Зубарева, П. Я. Сандаков, Э. С. Горовиц // Вестник хирургии. – 2003. – Т. 162, № 2. – С. 109-113.
9. Михайлова Е. С. Микробиоценозы эзофагогастродуоденальной зоны у больных с патологией желчевыводящих путей: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е. С. Михайлова. – М., 2009. – 24 с.
10. Серова Е. В. Профилактика постхолецистэктомического синдрома у больных острым калькулезным холециститом: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е. В. Серова. – Красноярск, 2010. – 25 с.
11. Товмасын А. С. Значение симбиотических взаимодействий пиогенного стрептококка при хроническом тонзиллите: Автореферат дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2009. – 24 с.
12. Черкасов В. А. Антибиотики в хирургии желчных путей / В. А. Черкасов, Н. А. Зубарева, Э. С. Горовиц // Вестник хирургии. – 2002. – Т. 161, № 2. – С. 111-114.
13. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy / ed. J. L. Pace, [et. al.]. – Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. – 495 p.
14. Donlan R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15, № 2. – P. 167–193.
15. Flemming H. C. The EPS matrix: the "house of biofilm cells" / H. C. Flemming, T. R. Neu, D. J. Wozniak // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189, N 22. – P. 7945–7947.
16. Hall-Stoodley L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11, №7. – P. 1034–1043.
17. Manos J. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung / J. Manos, [et. al.] // J. of Med. Microb. – 2008. – № 57. – P.1454-1465.
18. Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs / A. Pascual // Clin. Microbiol.Infect. – 2002. – Vol. 8, № 5. – P. 256–264.
19. Qiu D. ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* / D. Qiu, [et. al.] // Microbiology. – 2008. – № 154. – P. 2119 –2130.
20. Roberts M. E. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells / M.E. Roberts, P.S. Stewart // Microbiology. – 2005. – № 151. – P. 75–80.
21. Tomaras A. P. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology / A. P. Tomaras, [et. al.] // Microbiology. – 2008. – № 154. – P. 3398–3409.

22. Williams P. Quorum sensing, communication and crosskingdom signalling in the bacterial world / P. Williams // *Microbiology*. – 2007. – № 153. – P. 3923–3938.
23. Xiong Y. Q. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia In Vitro and in an Experimental Endocarditis Model / Yan Q. Xiong, [et. al.] // *J. of Inf. Dis.* – 2009. – № 199. – P. 201–209.

**Рецензенты:**

Петрушко С. И., д.м.н., профессор кафедры общей хирургии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого», г.Красноярск.

Здзитовецкий Д. Э., д.м.н., доцент, зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. Ю. М. Любенского, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого», г. Красноярск.