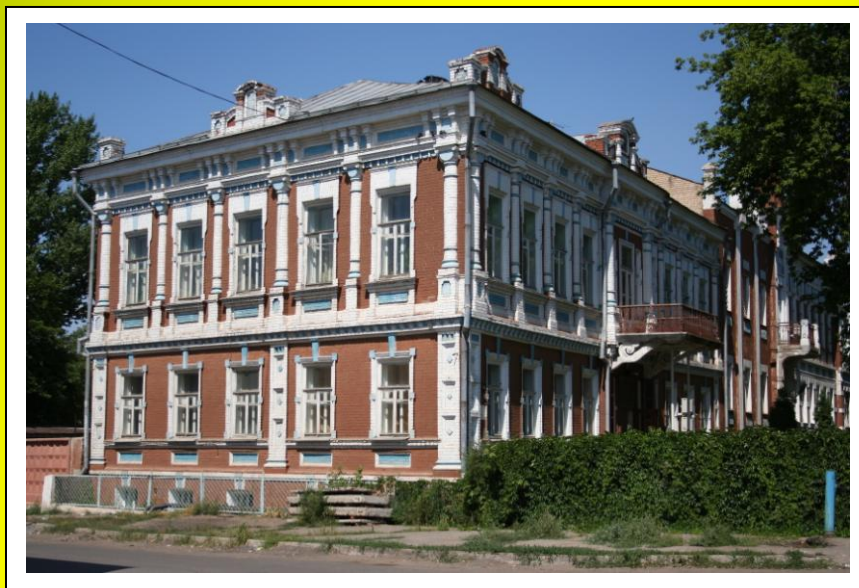


ISSN 2304-9081

**Учредители:**  
Уральское отделение РАН  
Оренбургский научный центр УрО РАН

**Бюллетень**  
**Оренбургского научного центра**  
**УрО РАН**  
(электронный журнал)



**2013 \* № 3**

On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2013

УДК 616 – 022.7: 579.841.11

И.А.Мележик<sup>1</sup>, Н.В. Яворская<sup>1</sup>, В.В.Шепелевич<sup>1</sup>, В.Н.Козозей<sup>2</sup>

## **РОЛЬ БИОПЛЁНОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В РАЗВИТИИ ЭНДОГЕННЫХ ИНФЕКЦИЙ**

<sup>1</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Научно-учебный центр «Институт биологии», Киев, Украина

<sup>2</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, химический факультет, Киев, Украина

Обзор посвящен роли биопленок в патогенезе инфекций *Pseudomonas aeruginosa* - одного из наиболее распространенных возбудителей эндогенных и оппортунистических инфекций. Перечислены возможные сайты колонизации псевдомонадами тканей организма человека, а также медицинских устройств. Рассмотрены факторы патогенности *P.aeruginosa*, их механизм действия и клинические проявления.

Детально описано значение в патогенезе инфекций псевдомонад биопленки, рассмотрены этапы ее формирования и регуляция этого процесса системами кворум сенсинга, а также механизмы устойчивости биопленок *P.aeruginosa* к антимикробным препаратам. В качестве иллюстрации приведены данные авторов о сравнительной чувствительности биопленочной и планктонной формы *P.aeruginosa* к комплексным соединениям ванадия и меди. Показано значительное превышение биопленко-ингибирующих концентраций исследованных соединений над их минимальными ингибирующими концентрациями, что доказывает важность данных про действие препаратов на биопленочные формы бактерий для клинической практики.

Особое внимание уделено современным стратегиям борьбы с биопленками при терапии инфекций *P.aeruginosa*; составлена схема возможных мишеней для антибиопленочных препаратов в зависимости от стадии формирования биопленки.

*Ключевые слова:* *Pseudomonas aeruginosa*, биопленка, эндогенные инфекции, гетерометаллические соединения, резистентность.

I.A. Melezhyk<sup>1</sup>, N.V. Yavorskaya<sup>1</sup>, V.V. Shepelevich<sup>1</sup>, V.N.Kokozay<sup>2</sup>

## **THE ROLE OF BIOFILM IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ENDOGENOUS INFECTIONS**

<sup>1</sup> Educational and Scientific Centre «Institute of Biology», National Taras Shevchenko University of Kyiv, Ukraine.

<sup>2</sup> Chemical faculty, National Taras Shevchenko University of Kyiv, Ukraine.

This article reviews the role of biofilms in the infection process of *Pseudomonas aeruginosa* – a common cause of endogenous and opportunistic infections. The possible colonization sites of human tissues and medical devices are listed; also, *P.aeruginosa* pathogenity factors, their mechanism and clinical symptoms are outlined.

The significance of biofilm in *Pseudomonas* infections pathogenesis is described in detail. Biofilm formation stages, the regulation of this process with quorum-sensing systems and biofilm resistance to antimicrobial agents are reviewed. As an example of *Pseudomonas* biofilm resistance, the authors` data on the comparative susceptibility of *P.aeruginosa* biofilm and planktonic form to the complex Cuprum and Vanadium compounds are presented. The biofilm-inhibiting concentrations of studied compounds in all cases were notably higher, than minimal

inhibitory concentrations, proving the clinical importance of biofilm susceptibility tests.

Particular attention is given to the modern strategies of anti-biofilm therapy. The scheme of anti-biofilm strategies is composed, defining the possible targets for interruption of biofilm formation process.

*Key words:* *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, endogenous infections, heterometallic compounds, resistance.

**1. Общая характеристика инфекций, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*.** *Pseudomonas aeruginosa* является одним из важнейших возбудителей оппортунистических инфекций и занимает третье место по распространенности (после *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*), вызывая около 10% всех нозокомиальных инфекций [1].

При этом особенностью псевдомонадных инфекций является их хронический характер; в случаях, когда инфекция достигает определенного уровня развития у пациентов со сниженной иммунной защитой, рекомендуют пожизненную антибиотикотерапию [2], так как достичь полной элиминации возбудителя не представляется возможным.

Способность псевдомонад на протяжении длительного периода времени персистировать в организме человека требует от микроорганизма эволюционно выработанных механизмов защиты – как от принимаемых мер лечения, так и от иммунной системы организма-хозяина. У *P. aeruginosa* реализуется сразу несколько механизмов разной направленности, которые обеспечивают такую защиту.

Одной из наиболее эффективных стратегий колонизации псевдомонадами макроорганизма является образование биопленки. В окружении полисахаридного матрикса клетки становятся невидимыми для иммунной системы - показано, например, что антитела против *P. aeruginosa* не опсонизируют биопленку [3, 4]. В дополнение к этому экзополисахариды затрудняют диффузию антибактериальных препаратов и защищают биопленку от механического удаления и высыхания.

Кроме того выявлено явление внутриклеточного паразитизма псевдомонад, когда клетки организма-хозяина используются как резервуары для микроорганизмов. Подобное явление обнаружено и для других видов бактерий [1]. В случае *P. aeruginosa* такая инвазия наблюдается, как правило, в эпителиальных клетках при заражении мочеполовых путей, обычно возле входных ворот инфекции, где концентрация возбудителя особенно большая.

При этом возбудитель также не поддается опсонизации и защищен от распознавания иммунной системой; если в биопленках барьером для антител служит экзополисахарид, то при внутриклеточном паразитизме – сами клетки организма-хозяина.

Одной из наиболее опасных инфекций, вызываемых *P. aeruginosa* являются воспалительные процессы легких и верхних дыхательных путей. Детально изучена роль псевдомонад в заболеваниях легких при цистическом фиброзе – патологии, при которой нарушается транспорт слизи эпителием верхних дыхательных путей, а значит, отсутствует природный барьер от попадания в легкие микроорганизмов [3, 5]. Колонизация легких *P. aeruginosa* у пациентов с таким заболеванием часто оказывается неизлечимой, и больным требуется проходить терапию антибиотиками на протяжении всей жизни.

Экзополисахариды *P. aeruginosa* защищают клетки бактерий от действия активных форм кислорода, выделяемых клетками иммунной системы. При этом образовавшиеся активные радикалы повреждают окружающие ткани, еще больше усиливая воспаление. Более того, доказано, что присутствие супероксид-радикала вызывает у *P. aeruginosa* мутации, которые, в свою очередь, приводят к смене бактериями фенотипа – переходу в мукоидную форму [5, 6]. Мукоидные *P. aeruginosa* характеризуются повышенным синтезом альгината и намного более агрессивно образуют биопленку; имеются также данные об изменении у мукоидных форм характера окраски по Граму, что может быть ценно для диагностики стадии болезни [6].

*Pseudomonas aeruginosa*, наряду со стафилококками и стрептококками, часто является причиной ряда ЛОР-заболеваний – хронических отитов, тонзиллитов, синуситов. Однако здесь инфицирование происходит, преимущественно, из экзогенных источников. Сама анатомия ЛОР-органов благоприятна для развития биопленки, и почти в 60% случаев инфекций отмечают ее присутствие [1].

*P. aeruginosa* – второй по частоте, после *Staphylococcus aureus*, возбудитель хронических инфекций ран и ожогов [7, 8]. Важной характеристикой таких инфекций является то, что образованная возбудителями биопленка переносит любые физические условия, чрезвычайно устойчива к высыханию, а во влажной среде (при закрытых перевязках) интенсивно развивается. Кроме того в условиях закрытых перевязок возрастает риск размножения возбу-

телей анаэробных инфекций.

Общий вклад *P. aeruginosa* в развитие раневых инфекций составляет около 10% [1]. Особенно затяжные, хронические инфекции наблюдаются у пациентов со сниженным иммунным статусом; часто именно псевдомонадные инфекции являются причиной незаживающих трофических язв при сахарном диабете [9].

Еще одной особенностью *Pseudomonas aeruginosa*, в отличие от более распространенных возбудителей, таких как стафилококки, является локализация микробных клеток в глубоких слоях тканей, а не на поверхности ран [1]. Это затрудняет не только лечение, но и диагностику, так как смывы с раневой поверхности оказываются малоинформативными, и для выделения возбудителя в культуру требуется биопсия.

Зарегистрированы случаи инфекционных эндокардитов, вызванных *P. aeruginosa*. Чаще всего они ассоциированы с септициемией. Как правило, происхождение инфекции эндогенное – циркулирующие в крови возбудители могут оседать на центральных клапанах сердца и окружающих тканях. Еще больший риск эндокардита существует при наличии в сердце искусственных клапанов, катетеров, водителей ритма, которые служат дополнительными субстратами для образования биопленки. Менее опасны правосторонние эндокардиты, которые поддаются антибиотикотерапии в 50-75% случаев; при инфекциях левых отделов сердца обычно требуется хирургическое вмешательство [10].

Офтальмиты чаще всего ассоциируются с экзогенными возбудителями, а случаи попадания инфекции в ткани глаз из кровеносного русла достаточно редки [11]. Несмотря на это, в последнее время появляются описания клинических случаев эндогенного псевдомонадного офтальмита. При этом чаще всего эндофтальмит развивается как заболевание, сопутствующее иммуносупрессивным состояниям (цистическому фиброзу, сахарному диабету, ВИЧ), или воспалительным заболеваниям (эндокардиту, воспалению легких, пневмонии), то есть при наличии значимого эндогенно источника инфекции и высокой концентрации возбудителя в крови.

Инфекции роговицы глаза чаще всего вызваны экзогенно проникшими возбудителями. Не исключение и инфекции *P. aeruginosa*; особенно увеличилась их частота с возрастанием использования контактных линз [12, 13]. По-

лимерные материалы, которые используют для изготовления линз, являются подходящим субстратом для адгезии псевдомонад и образования биопленки. Согласно данным L. McLaughlin-Borlace et al. (1998), *Pseudomonas aeruginosa* наиболее часто встречающийся контаминант поверхности контактных линз. Следствием таких колонизаций являются язвенные кератиты, которые быстро прогрессируют и могут приводить к потере зрения [13].

Наиболее редко из инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, наблюдают инфекционные остеомиелиты [3]; они, как и офтальмиты, могут развиваться двумя основными путями: в результате травмы или хирургического вмешательства или же эндогенно, при попадании возбудителя из крови в надкостницу (в 20% случаев); возможен также переход инфекции на кость из близлежащих тканей.

**2. Роль *P.aeruginosa* в имплант- и катетер-ассоциированных инфекциях.** Особенно возрастает риск инфекций, ассоциированных с образованием биопленки, в том числе и формируемой *P. aeruginosa*, при использовании инвазивных медицинских устройств. В настоящее время в клиническую практику введено чрезвычайно большое количество различных типов имплантов, протезов, катетеров. Многие из них устанавливаются пожизненно или на длительный срок. Зачастую от работы таких устройств (например, водители сердечного ритма или аппараты искусственной вентиляции легких) зависит поддержание жизни в принципе.

В таком случае, инфицирование импланта может иметь самое критическое значение. Общая тенденция имплант-ассоциированных инфекций такова, что в присутствие инородного тела любое воспаление намного более рискованно и в разы чаще переходит в хроническую форму. По данным A. Trampuz и W. Zimmerli (2006), наличие импланта увеличивает риск воспаления в 100 и больше раз, так что даже минимальная контаминация приводит к абсцессу [14]. Показано, что инфекции имплантов никогда не проходят самопроизвольно [15, 16]. Причиной этого является, во-первых, отсутствие у искусственных объектов поверхностных антигенов и каких-либо средств иммунной защиты, которые делают их безопасным и удобным местом для концентрации возбудителя; во-вторых, трудность доступа для иммунных клеток организма ко всем поверхностям импланта, что делает его недоступным для очищения резервуаром для персистирующих микроорганизмов.

К наиболее распространенным возбудителям имплант- и катетер-ассоциированных инфекций относятся возбудители оппортунистических заболеваний, такие как стафилококки и стрептококки, *E. coli* и *P. aeruginosa* [16].

Как правило, рассматривается лишь один путь развития имплант- и катетер-ассоциированных инфекций, а именно экзогенный: контаминация самого устройства, заражение во время операции или попадание возбудителя извне. В ряде случаев так и происходит, особенно если устройство (как правило, катетеры) имеет сообщение с внешним пространством.

Входными воротами для экзогенных инфекций, чаще всего, выступают урологические катетеры. Источником заражения *P. aeruginosa*, как правило, является кожа; сам же катетер используется бактериями для размножения и проникновения в мочеполовые пути, откуда инфекция может распространяться дальше и сопровождаться септиемией [1].

Однако при исследовании хронических септицемий *P. aeruginosa* у пациентов с внутривенными катетерами [16] было установлено, что на ранних стадиях заболевания, на смывах с самого катетера выделить псевдомонады удавалось лишь в 1% случаев, несмотря на их присутствие в крови пациентов. Позднее псевдомонады колонизировали катетер, и заболевание переходило в хроническую стадию. Полученные данные могут указывать на то, что источник заболевания эндогенный, а катетер лишь усугубляет ситуацию, создавая дополнительную поверхность для концентрации возбудителя.

Гематогенным путем могут инфицироваться и протезы клапанов сердца, причем одинаково часто колонизируются как искусственные, так и пересаженные свиные клапаны – не будучи васкуляризированной, ткань проявляет такие же свойства, как и абиотический материал.

Закрытые импланты опорно-двигательной системы, например протезы суставов или фиксирующие спицы, не имеют непосредственного соединения с кровотоком, однако также могут инфицироваться как экзогенным, так и эндогенным путем. При эндогенных хронических инфекциях протезов суставов, значительная часть которых вызвана *P. aeruginosa* [17], отмечают существование возбудителя в виде «фенотипа отдельных колоний», то есть в небиопленочной форме. Персистирование бактерий обеспечивается уже рассмотренным выше внутриклеточным паразитизмом в прилегающих к суставу

тканях. Это дает возможность предположить, что эндогенным путем бактерии заносятся в имплант не только гематогенно, но и мигрируя по тканям. По данным R.R. Laffer et al. [18], около 38% всех имплант-ассоциированных инфекций имеют эндогенное происхождение.

Возможно, область импланта привлекает микроорганизмы вследствие имеющегося, в результате хирургического вмешательства, повреждения тканей, удобного для колонизации.

Наиболее редкие случаи представляют собой инфекции нервной системы, хотя они также не исключены. Один из путей такой инфекции возможен при использовании кохлеарных имплантов [16]: мигрируя вдоль электрода импланта и слухового нерва, экзогенные микроорганизмы, например возбудители отитов, могут попадать в ЦНС.

Зубные протезы также колонизируются микроорганизмами с небольшой частотой [3], и преимущественно экзогенно. Обычно же биопленка нормофлоры ротовой полости развивается на зубных имплантах так же, как и на остальных зубах. Впрочем, при остром сепсисе возможно занесение микроорганизмов с током крови, приводящее к воспалению зубных протезов.

Общим следствием почти всех имплант- и катетер-ассоциированных инфекций является потребность в удалении импланта, так как часто при интенсивном образовании на устройстве биопленок, в том числе с участием *P. aeruginosa*, бессильна даже интенсивная антибиотикотерапия [15, 16]. В таких случаях рекомендуют, если это возможно, на некоторое время до полного излечения инфекции не устанавливать пациенту нового импланта. Если устройство жизнеподдерживающее и требует немедленной замены, новый имплант тщательно обрабатывают индивидуально подобранными антимикробными препаратами [16].

Литературные данные про вклад *Pseudomonas aeruginosa* в общее число инфекций тканей организма человека и абиотических субстратов, а также встречаемость биопленки при таких инфекциях представлены в таблице 1.

**3. Нозокомиальные инфекции *P. aeruginosa* и причины внутрибольничных эпидемий.** *Pseudomonas aeruginosa* – распространенный нозокомиальный патоген, вызывающий около 10% внутрибольничных эпидемий [3]; 18% инфекций в отделениях интенсивной терапии и 6% – в хирургии [19].



Табл. 1. Возможные субстраты для колонизации *Pseudomonas aeruginosa* в организме человека

Субстрат	Заболевание	% <i>P. aeruginosa</i> от общего числа возбудителей	Наличие биопленки	Источник
<i>Колонизация живых тканей</i>				
Кожа	хронические раны	9-10 %	+ (60%)	James et al. (2008)
	острые воспаления ран	9-10 %	+ (6%)	Bodey et al. (1983)
Эпителий легких	воспаления легких	54%	+	Ciofu et al. (2005)
	воспаления дыхательных путей	17%	+	Bodey et al. (1983)
Кровь	септемия	8-17%	-	cat
Эндокардий и клапаны сердца	эндокардиты	10%	?	Gouello et al. (2000)
Роговица глаза	язвенные кератиты	3-33	?	AAO (2011)
Ткани глаза	эндофтальмит	<30%	?	Jackson, 2008
Костная ткань	остеомиелит	2%	?	Bodey et al. (1983)
Полость уха	отиты	до 70%	+	Bodey et al. (1983)
	холестеатома	?	+ 66%	Chole, Faddis (2002)
Эпителий полости носа	риносинуситы	20%	+ 60-70%	Prince et al. (2008)
<i>Колонизация абиотических субстратов</i>				
Контактные линзы	кератиты	7-28%	+	McLaughlin-Borlace et al. (1998)
Внутривенные катетеры	септемии	7-14%	+	Seifert (2005)
Урологические катетеры	воспаления мочеполовых путей	10%	+	Bodey et al. (1983)
Искусственные клапаны сердца	эндокардиты	10%	?	Gouello et al. (2000)
Водители ритма	эндокардиты	до 17%	?	Chua et al. (2000)
Протезы суставов	септические артриты	2%	?	Jerry et al. (1971)
Зубные протезы	потеря импланта	очень редко	?	Zimmerli (2004)

По данным A.F. Widmer [20], из общего числа нозокомиальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, 33% составляют урологические инфекции; 13% - сепсисы; 16% - инфекции при операциях; 16% - пневмонии и 22% -

прочие. Опасность представляет очень высокий уровень летальности (50-60%), ассоциированный с нозокомиальными бронхопневмониями, вызванными *P. aeruginosa*.

*P. aeruginosa* не принадлежит к нормальной микрофлоре человека, но их носителями являются около 2-10% людей. В больницах уровень носительства может возрастать до 50% [19]. В условиях больниц выявлен высокий уровень передачи *P. aeruginosa* от пациента к пациенту. Так, от 25 до 50% нозокомиальных инфекций являются результатом кросс-колонизации [21].

Одним из наиболее значимых источников нозокомиальных инфекций *P. aeruginosa* являются резервуары воды. Согласно исследованиям по выявлению источников нозокомиального заражения псевдомонадами [22], около 82% раковин в больницах контаминированы *P. aeruginosa*; кроме того культивировать псевдомонады удалось из смывов рук персонала и даже растворов дезинфектантов. Некоторыми авторами подчеркивается роль не только экзогенных источников *P. aeruginosa*, но и носительства среди пациентов [19]: с помощью молекулярного типирования штаммов *P. aeruginosa* было определено, что лишь 1 из 14 пациентов был заражен псевдомонадами непосредственно экзогенным путем.

**4. Факторы патогенности *P. aeruginosa*.** Инфекционный процесс с участием *P. aeruginosa* принято разделять на стадии инвазии, локальной инвазии и системной инфекции. Особенностью псевдомонад является наличие у них необычайно широкого спектра механизмов патогенности, которые включаются на том или ином этапе и превращают инфекцию в планомерный и тщательно организованный захват макроорганизма [23-25].

Факторы патогенности *P. aeruginosa*, их механизм, роль в инфекционном процессе и клинические проявления суммированы в таблице 2.

На стадии инвазии основную роль играют механизмы адгезии и локального передвижения по тканям. Показано, что, если адгезия *P. aeruginosa* к абиотическим поверхностям обусловлена неспецифическими взаимодействиями (например за счет разницы заряда), то адгезия к живым тканям осуществляется строго специфически – путем контакта с рецепторами эукариотической клетки. Для локального продвижения возбудитель деградирует ткани макроорганизма, используя ферменты (протеазы и фосфолипазы), а также систему секреции III, которая может доставлять синтезированные токсины и

ферменты непосредственно в эукариотическую клетку.

Табл. 2. Факторы патогенности *P.aeruginosa*, их механизм, функция и клинические проявления с учетом стадии инфекционного процесса

Фактор патогенности	Механизм	Функции для микроорганизма	Клинические проявления
1	2	3	4
<i>1. Инвазия</i>			
пили	адгезия к тканям, хемотаксис	основа для формирования биопленки	миграция возбудителя; воспаление
щелочная протеаза	деградация фибрина, эластина, коллагена других белков	деградация тканей, ингибирование системы комплемента, инвазия и защита от иммунной системы	некрозы, геморрагии, в ряде случаев язвы – гангренозная эктима
фосфолипаза С	расщепление лецитина	деструкция легочного сурфактанта, колонизация легких	ателектаз, некроз тканей легких
система секреции III	иглоподобная структура, секретирующая бактериальные токсины	секреция токсинов внутрь эукариотических клеток	некрозы, деградация тканей
<i>2. Локальная инвазия; размножение и концентрация возбудителя.</i>			
1	2	3	4
альгинат	токсический для нейтрофилов, маскирует клетки для иммунной системы и служит основой для биопленки	защита от иммунной системы и концентрация возбудителя	хронические инфекции
сидерофоры	хелатирование железа сигнальные молекулы	регуляция синтеза других факторов вирулентности	спящие инфекции
пиоцианин	кворум сенсинг; ингибирование факторов роста других бактерий	размножение и колонизация	очень редко - «синдром зеленых ногтей»
биопленка	концентрация и размножение клеток в полисахаридном матриксе	персистенция, маскировка от иммунной системы, устойчивость к препаратам	хронические инфекции, инкурабельность
системы кворум сенсинга	передача информации путем специальных химических медиаторов	кооперация, регуляция синтеза факторов вирулентности	затихание инфекции до накопления достаточного количества клеток

Табл. 2. (Продолжение)

3. Защита от иммунной системы и стрессовых факторов.			
1	2	3	4
цитотоксин (лейкоцидин)	лизис мембран лейкоцитов	гибель лейкоцитов, распространение возбудителя	воспалительные реакции
ЛПС	эндотоксическое действие, антифагоцитозный эффект	защита от иммунной системы	аллергические реакции
AmpC бета лактамаза	деградация антипсевдомонадных пенициллинов	устойчивость к антибиотикам	неэффективная терапия
метаболическая вариативность	быстрая реакция на изменение условий	адаптация к стрессовым факторам	неэффективная терапия
мукоидный полисахарид	сверхпродукция капсул	защита от АФК* клеток иммунной системы, повреждение тканей макроорганизма	воспалительные реакции
рамнолипид	каналы в биопленке, блокирование бета-дефензинов, конкуренция с другими бактериями	колонизация и защита от иммунной системы	неэффективная терапия, иммуносупрессия
4. Диссеминация по организму и системная инфекция			
эластаза	деградация коллагена ингибирует хемотаксис моноцитов	миграция по тканям	бестромбозные васкулиты
гемолизины	лизис клеток организма хозяина высвобождение собственных ферментов макроорганизма	деградация тканей и колонизация организма	язвы, деструкция тканей
флагеллы, пили	хемотаксис	диссеминация	пирогенные реакции
экзофермент S	АДФ-рибозилирование, также эффектор системы секреции III	нарушение функций фагоцитирующих клеток, инвазия	воспаление, пирогенные реакции
экзотоксин А	АДФ рибозилирование эукариотического фактора элонгации II	ингибирование синтеза белка некроз	некрозы, реактивная эритема, нейтропения

Примечание: \* - АФК – активные формы кислорода.

На этапе локальной инвазии (2) происходит размножение возбудителя и достижение им количества, достаточного для системной инфекции. Наилучшим защитным механизмом для этой стадии является образование биопленки. На этом этапе часто снижается вирулентность микроорганизма; в от-

личие от первой и последней стадий, почти отсутствуют клинические проявления. Включается большая группа механизмов, направленных на защиту от иммунной системы и стрессовых факторов (3).

Последняя стадия, или системная инфекция, наступает после достижения возбудителем некоторой пороговой концентрации. Происходит распространение бактерий по всему организму, часто на этой стадии биопленка диспергируется и разносится с кровотоком наподобие «метастазов» [3].

**5. Процесс формирования биоплёнки *P. aeruginosa* и его генная регуляция.** По сложности организации биопленку сравнивают с тканью многоклеточного организма [1]. Именно в биопленке, в намного большей степени, чем в планктонной культуре, развита межклеточная сигнализация (кворум сенсинг), что позволяет микроорганизмам эффективно координировать скорость размножения и вирулентность. Имеется также система неклеточных структур (каналов для воды и питательных веществ), которая напоминает примитивные транспортные структуры у многоклеточных организмов.

Этапы формирования биопленки общеизвестны, это первичная адгезия, необратимое прикрепление, созревание и распад биопленки [26]. В последнее время все больший интерес проявляют именно к последнему этапу, так как выделены сигнальные молекулы бактерий, вызывающие дезагрегацию биопленки, и в перспективе этот процесс может быть управляемым.

После распада биопленки составляющие ее клетки возвращаются к планктонному состоянию. Примечательно то, что клетки из диспергированной биопленки часто так же чувствительны к антибиотикам, как и клетки планктонной культуры, то есть вне биопленки не имеют специфической устойчивости [1, 23]. После выхода из биопленки клетки могут разноситься с током жидкости и снова оседать на поверхностях, образуя ее, то есть этот процесс может быть циклическим [27]. Особенно важна такая цикличность в инфекционном процессе, когда патогены из биопленки распространяются в отдаленные ткани, что позволяет возбудителю полностью колонизировать организм.

Вопреки распространенному мнению о том, что биопленка формируется тем легче, чем меньше скорость потока жидкости, доказано противоположное. Так, замечено, что при колонизации тканей в экспериментальных условиях в первую очередь биопленка формируется на стенках сосудов [1].

Это явление связывают с тем, что в условиях более сильного потока жидкости бактерии вынуждены создавать более структурированную и упорядоченную биопленку.

Наблюдения по архитектуре и общей организации биопленок получают в основном из моделей *in vitro*, на абиотических субстратах. Что же касается биопленок *in vivo*, то для них отмечают более простую структуру и «сглаженность», так как, возможно, под действием стрессовых факторов отдельные микроколонии (структурные единицы биопленки) не успевают разрастись до достаточных размеров и сформировать классические «грибоподобные» структуры [3].

Организация свободноплавающих бактерий в форму биопленки является сложным процессом, требующим от микроорганизма синтеза нетипичных для планктонной формы веществ. Тогда логично предположить, что образование биопленки должно регулироваться особыми группами генов, неактивными в планктонной культуре.

Было показано, что некоторые стадии процесса образования биопленки могут находиться под регуляцией сигма-фактора RpoS, который в стационарной фазе роста планктонной культуры управляет реакцией клетки на стресс; есть данные, что RpoS регулирует также кворум-сенсинг у *P. aeruginosa* [27].

Одним из основных продуктов, необходимых для образования биопленки у *P. aeruginosa*, является экзополисахарид альгинат, синтез которого регулируется кластером генов algACD. Продукция альгината в биопленках увеличивается по сравнению с планктонной культурой примерно в 19 раз [3].

В то же время показано, что экспрессия генов у *P. aeruginosa* в форме биопленки и на стационарной фазе планктонной культуры отличаются не более чем на 10% [28]. Таким образом, наличие специфических генов-регуляторов биопленки остается спорным вопросом.

**6. Роль кворум сенсинга в биоплёнках *P. aeruginosa*.** Организация бактерий в упорядоченную структуру – биопленку – невозможна без координации действий с помощью системы сигнальных молекул – кворум сенсинга. Сегодня расшифрована структура десятков молекул кворум сенсинга, характерных как для сигнализации только у грампозитивных (короткие циклические пептиды) и грамотрицательных бактерий (ацил-гомосеринлактоны), так и для межвидовых коммуникаций (фуранозилборат диэферы) [29].

**Сигнальные молекулы системы AHL.** Основные сигнальные молекулы у *P. aeruginosa*, как и у других грамотрицательных бактерий – ацил-гомосеринлактоны (AHL). Имеются данные, что молекулы системы AHL могут регулировать 6-10% всего генома псевдомонад [27]. Известны два основных типа характерных для псевдомонад AHL: (3-оксододеcanoил)-L-гомосерин лактон (3OC12-HSL), и N-бутаноил-L-гомосеринлактон (C4-HSL) [30].

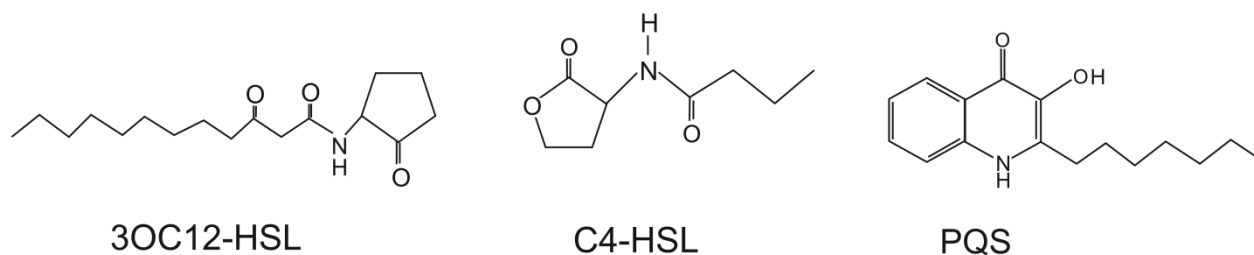


Рис.1. Молекулы кворум сенсинга у *Pseudomonas aeruginosa*: (3-оксододеcanoил)-L-гомосерин лактон (3OC12-HSL); N-бутаноил-L-гомосеринлактон (C4-HSL); 3-гидрокси-4(1H)-хинолон (PQS).

Известно, что эти молекулы взаимодействуют в иерархической манере. Так, 3OC12-HSL препятствует включению генов, активатором которых является C4-HSL, пока количество C4-HSL не достигнет некоторого критического уровня [1]. В опытах *in vitro* у мутантов, не способных синтезировать 3OC12-HSL, формирование полноценной биопленки не происходило [30]. Одной из функций C4-HSL является активация синтеза рамнолипида [1], необходимого для дифференцировки биопленки и формирования системы каналов; возможно, включение функций C4-HSL необходимо после прохождения начальных стадий под регуляцией 3OC12-HSL, что и является причиной иерархии сигнальных молекул.

Взаимодействуя между собой, оба гомосеринлактона 3OC12-HSL и C4-HSL контролируют включение факторов вирулентности, передвижение по тканям и маскировку от иммунной системы, то есть практически все стадии инфекционного процесса [30].

Молекулы системы AHL используются не только бактериями семейства *Pseudomonas*, но, теоретически, могут восприниматься другими грамотрицательными бактериями. Такое явление наблюдалось в смешанных биопленках

*P. aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* [31]. При этом, хотя *B. cepacia* использует для внутривидовой коммуникации другой тип сигналов AHL (C8-HSL), наблюдалась восприимчивость *Burkholderia* к сигналам *Pseudomonas* 3OC12-HSL и C4-HSL; при этом реакции *Pseudomonas* на сигналы *Burkholderia* не наблюдалось.

**Хинолоновый сигнал псевдомонад (PQS).** В отличие от многих видов грамотрицательных бактерий, кворум сенсинг которых регулируется исключительно ацил-гомосеринлактонами, у *P. aeruginosa* присутствует дополнительная система сигнальных молекул, а именно PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) [32-33], по структуре представляющий собой 3-гидрокси-4(1H)-хинолон (рис. 1). Эта система кворум сенсинга взаимодействует с AHL, совместно с ней регулируя продукцию факторов вирулентности (рамнолипида, пиоцианина, эластазы), однако не является полностью от нее зависимой [27]. Имеются данные о том, что PQS может регулировать количество синтезируемых на данной фазе роста продуктов, в частности факторов вирулентности, в зависимости от плотности популяции клеток [33].

**Аутоиндукторы-2 (AI-2, диэферы фуранозилбората).** Изучены также межвидовые коммуникации псевдомонад с помощью системы аутоиндукторов-2 (фуранозилборатэфиров). В частности, исследовано обмен AI-2 между *P. aeruginosa* и *Vibrio harveyi* [34]; показано, что *Pseudomonas* может отвечать на молекулы кворум-сенсинга *V. harveyi* (фуранозилборат дигидроксипентадиона), хотя самими псевдомонадами этот сигнал не формируют.

**Регуляция формирования биопленки молекулами кворум сенсинга.** Известно, что в биопленках концентрация сигнальных молекул кворум сенсинга на порядки превышает таковую в планктонной культуре. Так, T.S. Charlton et al. [35] показано, что в биопленках *P. aeruginosa* концентрация 3OC12-HSL возросла до 632 мкМ, по сравнению с 14 нМ в планктонной культуре. Такое резкое увеличение концентрации может означать лишь особую важность кворум-сенсинга для успешного формирования и структуризации биопленки. Действительно, основным условием для организации группой клеток биопленки является синхронизация синтеза экзополисахарида, факторов вирулентности, структурных компонентов (рамнолипида) – все эти функции регулируются молекулами системы AHL; кроме того, необходимо соотносить интенсивность синтеза продуктов с плотностью популяции и ре-



гулировать скорость деления клеток – такие возможности найдены у молекул PQS. В сериях опытов с мутантными штаммами *P. aeruginosa*, не способными синтезировать ацил-гомосеринлактоны D.G. Davies et al. [36], было показано отсутствие у биопленок развитой структуры по сравнению с исходным штаммом. Изучено также стимулирование формирования биопленки у *P. aeruginosa* при добавлении в среду экзогенного PQS [37]. Кроме того выявлено ингибирование посредством PQS подвижности *P. aeruginosa* типа «рое-ния», что, очевидно, может быть необходимо для закрепления биопленки и ограничения ее площади.

**7. Механизмы устойчивости биоплёнок к антимикробным препаратам.** Возможно, самой значимой в клинической практике и активно изучаемой является такая характеристика биопленок, как устойчивость к антибактериальным препаратам. Неоднократно замечено, что резистентность биопленок к антибиотикам в разы превосходит устойчивость планктонной культуры. Особая устойчивость наблюдается для биопленок *P. aeruginosa*, чувствительность которых к антибиотикам может уменьшаться до 1000 раз [3].

При хронических инфекциях устойчивой к антибиотикам *P. aeruginosa* в некоторых случаях наблюдается чрезвычайно длительное выживание возбудителя в форме биопленки даже при интенсивной антибиотикотерапии. Так, при цистическом фиброзе биопленки псевдомонад сохранялись в легких пациентов до 30 и более лет [38].

Существует множество гипотез о механизмах устойчивости бактерий к антимикробным агентам, которая связана с переходом культуры в биопленку; наиболее общепринятыми из них являются следующие.

- **Биопленка как барьер для диффузии антибиотиков.** Естественным препятствием для доступа антибиотиков к клеткам в биопленке является экзополисахаридный матрикс. Долгое время биопленку считали непроницаемым барьером для антибиотиков. Однако в последние годы было доказано проникновение ципрофлоксацина и тобрамицина через модели биопленок *P. aeruginosa* на искусственных мембранах [39]. Очевидно, прохождение антибиотиков через биопленку возможно благодаря системе каналов для воды и питательных веществ. При этом авторами отмечалась высокая устойчивость биопленок к данным антибиотикам. Предполагают, что причиной этого мо-

жет быть способность антибиотиков действовать лишь на небольшое количество метаболически активных клеток, находящихся в зонах с высоким содержанием кислорода.

Одним из специфических полисахаридов в биопленках, который может обеспечивать устойчивость к антибиотикам, являются периплазматические глюканы. Хотя они не препятствуют диффузии антибиотиков в биопленке, по данным T.F. Mah et al. [40], глюканы могут связывать тобрамицин и препятствовать его проникновению в клетки.

• **Селекция резистентных персистирующих клеток.** Одним из важных механизмов устойчивости к антибиотикам является селекция так называемых «персистирующих клеток» [1, 3]. Доказано, что под влиянием субингибирующих концентраций антибиотиков происходит некоторая естественная селекция устойчивых клеток, в результате чего до 10% микробной популяции составляют нечувствительные «клетки-персистеры». Этот механизм не является специфическим для биопленок; более того, при сравнении селекции устойчивых клеток в растущей планктонной культуре, планктонной культуре стационарной фазы и биопленке выявлено, что эффективнее всего этот процесс происходит в культуре стационарной фазы [1]. Причиной этого полагают полное отсутствие роста бактерий в стационарной фазе, даже по сравнению с биопленкой, мишеней для антибиотиков, которыми обычно являются процессы синтеза белка, клеточной стенки или ДНК, происходящие в фазы активного роста.

Под спецификой селекции «клеток-персистеров» в биопленке понимают присутствие некоторой части популяции, особенно в зонах с недостаточным доступом кислорода и питательных веществ, в дормантном состоянии, когда все процессы роста замедлены или приостановлены.

• **Влияние гетерогенности условий в биопленке.** На формирование рассмотренных выше персистирующих клеток большое влияние оказывает гетерогенность условий, естественным образом возникающая в биопленке. Разница доступа кислорода, питательных веществ, рН в разных слоях биопленки создает условия для одновременного существования клеток как с разной скоростью и направленностью процессов метаболизма, так и находящихся в разных фазах роста [41]. Такая гетерогенность представляет проблему при использовании антибиотика, действующего, например, лишь на фазе ак-

тивного роста микробных клеток; решением может быть комбинация нескольких антимикробных препаратов разного механизма действия.

- **Гипермутабельность в биопленках.** Помимо прочих, одним из источников селекции устойчивых к антибиотикам клеток является гипермутабельность в биопленках. *P. aeruginosa* отличается чрезвычайной мутабельностью. Так, под воздействием сильной антибиотикотерапии количество мутаций в биопленках *P. aeruginosa* может достигать 20% [3].

Основной причиной мутаций являются повреждения ДНК, часто вызванные оксидативным стрессом (например, под воздействием активных форм кислорода клеток иммунной системы), и нарушения систем репарации у бактерий (в частности, mismatch-репарации, [27]). В результате мутаций могут селекционироваться штаммы, устойчивые сразу ко многим антибактериальным препаратам (так называемые MDR – multidrug-resistant strains).

- **Эффлюксные помпы и ферментативная деградация антибиотиков.** Еще одним неспецифическим для биопленок механизмом резистентности являются системы активного выброса (эффлюкс) антибиотика, а также продуктов синтеза самой клетки. У *P. aeruginosa* на сегодня зарегистрировано 5 различных систем эффлюкса; предполагают наличие до 30 таких систем [42]. Одним из продуктов, транспортирующихся через эффлюксные помпы у *P. aeruginosa*, являются бета-лактамазы, обеспечивающие устойчивость к антипсевдомонадным пенициллинам [43].

- **Снижение общей вирулентности при формировании биоплёнок.** В экспериментальных условиях часто наблюдается феномен снижения общей продукции факторов вирулентности на этапе размножения и созревания биопленки [1]. Логически это явление обоснованно тем, что до достижения некоторого критического для колонизации всего организма количества возбудителя основную нагрузку будут иметь механизмы маскировки от иммунной системы и размножения клеток. В клинической практике это явление может проявляться как временное исчезновение симптомов после начального курса антибиотикотерапии и переход инфекции в латентную фазу.

**8. Сравнение устойчивости планктонных и биоплёночных форм *P. aeruginosa* к антибиотикам и дезинфектантам.** В связи с важностью роли биопленок в инфекционном процессе и необходимостью борьбы с ними в процессе лечения, необходимо адекватно количественно оценивать эффек-

тивность действия антимикробных препаратов не только на планктонные, но и на биопленочные формы возбудителя.

Как правило, для определения чувствительности культур к антибиотикам используют минимальные ингибирующие концентрации (МИК), которые отвечают минимальным бактериостатическим концентрациям и определяются по отсутствию видимого роста, и минимальные бактерицидные концентрации (МБК), которые определяют по отсутствию после действия антимикробного вещества жизнеспособных клеток [44, 45].

Такие же величины разработаны и предлагаются для введения в клиническую практику и для биопленок: биопленко-ингибирующая концентрация (БИК) – достигается при отсутствии видимого образования биопленки и минимальная биопленко-элиминирующая концентрация (МБЭК) – при полной гибели бактерий, образующих биопленку [47].

Как правило, МБК может в несколько раз превосходить МИК; то же соотношение наблюдается для МБЭК/БИК. В свою очередь, БИК может до 1000 раз превышать МИК той же культуры [35].

В качестве примера параллельного определения МИК и БИК можно привести полученные нами данные по чувствительности *P. aeruginosa* к гетерометаллическим соединениям, приведенные в таблице 3 и на рис. 2.

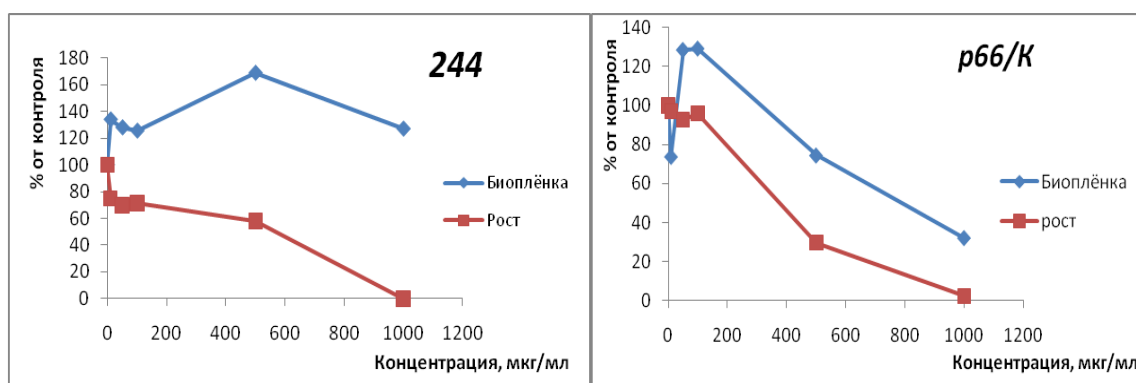
В таблице 3 приведены МИК и БИК *P. aeruginosa* в сравнении с другими тест-культурами бактерий. Очевидно, что *P. aeruginosa* наиболее устойчива из всех тест-культур как в планктонной форме, так и в форме биопленки к этим соединениям, поскольку ни одно из них не вызывало угнетения роста или формирования биопленки.

Достичь минимальной ингибирующей концентрации для *P. aeruginosa* удалось в двух случаях – с веществами 244 и р66/К. На рисунке 2 приведены данные по параллельным зависимостям «доза-эффект» для двух данных веществ планктонной культуры *P. aeruginosa* и биопленки.

Можно наблюдать, что в случае вещества 244 при выраженной тенденции к ингибированию роста планктонной культуры угнетения образования биопленки не происходит. Наоборот, наблюдается стимуляция этого процесса: в некоторых случаях интенсивность образования биопленки возрастает на 60%. Вероятно, что такой переход в биопленку реализуется *P. aeruginosa* как стратегия выживания.

Табл. 3. Сравнение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) и био пленко-ингибирующих концентраций (БИК) гетерометаллических соединений для *P. aeruginosa* и бактерий

Условное обозначение	Гетерометаллические координационные соединения					
	244		p66/к		p123	
Формула соединения	$(\text{H}_3\text{O})_2[\text{Mn}(\beta\text{-HAla})(\text{H}_2\text{O})_5][\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \times 2\text{H}_2\text{O}$		$(\text{NH}_4)_2[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]_2[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \times 4\text{H}_2\text{O}$		$\text{Cu}(\text{phen})_3\text{Mo}_2\text{O}_7 \times 8\text{H}_2\text{O}$	
Тест-культуры:	МИК (мкг/мл)	БИК (мкг/мл)	МИК (мкг/мл)	БИК (мкг/мл)	МИК (мкг/мл)	БИК (мкг/мл)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	500	>1000	>1000	1000	>1000
<i>Klebsiella pneumonia</i>	500	500	500	1000	500	1000
<i>Escherichia coli</i>	500	1000	1000	>1000	1000	>1000



А.

Б.

Рис.2. Параллельная зависимость интенсивности роста и формирования биопленки *Pseudomonas aeruginosa* от концентрации гетерометаллических соединений 244 (А) и p66/К (Б).

В случае с p66/К при малых дозах действующего вещества наблюдается резкая стимуляция формирования биопленки. Впоследствии же наблюдается тенденция к угнетению образования биопленки. Однако выход на БИК в исследованном диапазоне концентраций не зафиксирован, что свидетельствует о более высокой, как и ожидалось, устойчивости биопленки к действию гетерометаллического вещества.

**9. Современные стратегии контроля биоплёнок в стратегии и профилактики инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.** Для разработки методов

борьбы с биопленками необходимо учитывать этапность и цикличность их формирования, а также общие особенности бактерий в составе биопленок. На каждом из этапов развития биопленки можно воздействовать на нее, руководствуясь разными стратегиями, предупреждая развитие биопленки или вызывая ее распад. На рисунке 3 нами представлена предполагаемая схема возможных мишеней для антибиопленочных агентов с учетом этапа развития биопленки.

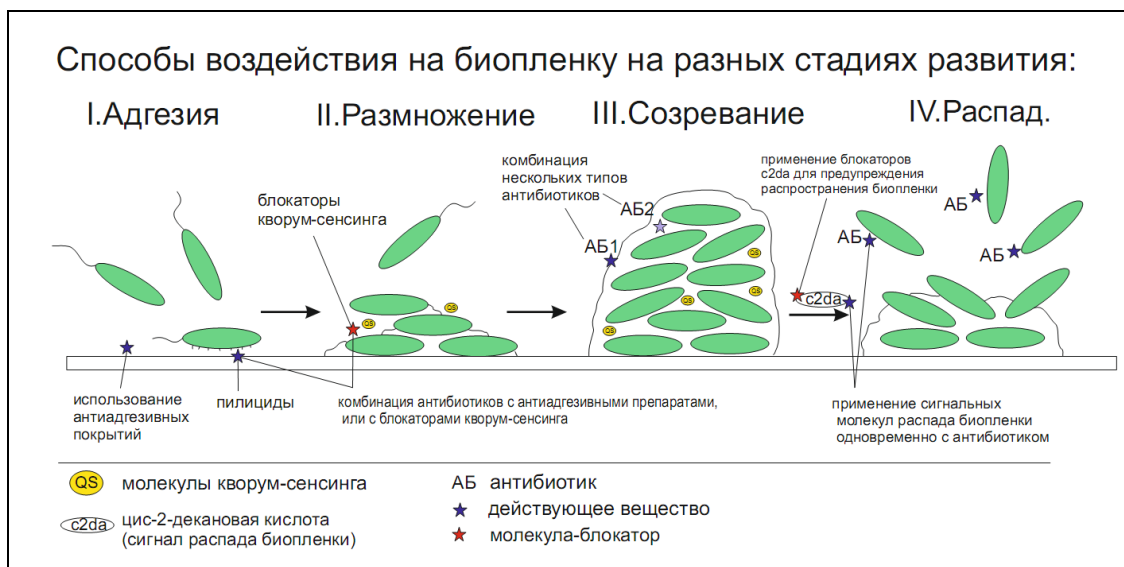


Рис.3. Возможные способы воздействия на биопленку *P. aeruginosa* на разных этапах формирования.

**Использование антиадгезивных покрытий.** Одной из наиболее простых стратегий является предупреждение адгезии бактерий к поверхности путем использования антиадгезивных покрытий. Такой метод подходит для использования в случае с абиотическими субстратами (имплантами или протезами) и был успешно протестирован для внутривенных катетеров [47]. В качестве антиадгезивных покрытий могут использоваться соединения металлов (например хлоргексидин-сульфазиадин серебра [48]) или комбинации антибиотиков (миноциклин-рифампицин) [49].

**Использование пилицидов.** Более специфическим способом воздействия на этапе адгезии является использование пилицидов – молекул, специфически нарушающих процесс синтеза адгезивных пилей. Эффект пилицидов был проверен *in vitro* [1], зафиксировано уменьшение ими адгезивности тест-культур до 90%. В перспективе такие соединения могут быть использованы, в отличие от антиадгезивных покрытий, для обработки живых тканей

**Блокаторы кворум сенсинга.** Одним из наиболее активно изучаемых методов борьбы с биопленками является использование аналогов кворум сенсинга. Так как системы кворум сенсинга, как было показано выше, регулируют большое число факторов вирулентности, блокирование этих систем может привести к значительному уменьшению патогенности *P. aeruginosa*. За последние годы синтезированы десятки молекул-ингибиторов AHL или PQS [50-52]. По структуре они являются аналогами сигнальных молекул с заменами спиртовой или амидной групп; например, N-(2-оксоцикло-гексил)-3-оксодеканамида, N-(2-гидроксифенил)-3-оксодеканамида [50], 4-bromo-5-(бормометил)-2(5H)-фуранон [51], энантиомеры и тиолактоны сигналов AHL [52] и др. Интересно, что вещества-блокаторы кворум сенсинга синтезируются и в природе; так, водоросль *Delisea pulchra* способна вырабатывать галогенизированный аналог AHL [51].

Стратегия блокаторов кворум-сенсинга является очень перспективной, однако поиски наиболее универсального и эффективного вещества-блокатора требуют дальнейшего исследования.

**Ингибиторы систем транспорта.** Одним из вариантов комплексного воздействия на продукцию факторов вирулентности у *P. aeruginosa*, кроме блокаторов кворум-сенсинга, является ингибирование транспорта бактериальных токсинов в эукариотическую клетку, которое осуществляется с помощью системы секреции III (T3SS).

Группой D. Aiello et al. (2010) синтезирован ряд соединений, который нарушает работу (T3SS) без влияния на рост клеток; наиболее эффективными из них являются ацилированные гидразоны и салицикляльдегиды. Эффект данных соединений протестирован *in vivo*; показано значительное уменьшение интенсивности воспалительных реакций и некрозов [53].

**Разрушение биопленки.** На стадии созревания биопленки, когда антиадгезивные средства не могут привести к желаемому эффекту, единственным способом терапии является разрушение биопленки. Для этого разработано несколько методов с использованием химических веществ или физических факторов.

**Ферментативное разрушение.** Для диспергирования биопленки необходимо, в первую очередь, деградировать стабилизирующие клетки биопленки внеклеточные полимерные соединения. Эффективно этого можно достичь

с помощью использования ферментов. Ферментами, разрушающими экзополисахариды *P. aeruginosa*, в моделях являются дисперсин В, деградирующий поли-N-ацетилглюкозамин [3], и альгинат-лиаза [54]. Последний фермент протестирован на хронических моделях биопленок *P. aeruginosa in vivo* и одобрен для введения в клиническую практику.

Выявлено также, что в биопленках *P. aeruginosa*, кроме экзополисахаридов, стабильность обеспечивается наличием внеклеточной ДНК [3]. По этой причине применение ДНКаз оказалось эффективной стратегией для дестабилизации биопленок [55]. Примечательно, что ДНКазы как антибиопленочный компонент содержатся на коже человека и животных.

*Препараты металлов.* Наиболее часто изучаемыми препаратами металлов являются уже упоминавшиеся соединения серебра. Исследованы биопленко-разрушающие свойства сульфадиазина серебра [48]. Кроме серебра, перспективные антибиопленочные свойства выявлены у ионов цинка [56]. Как область для применения препаратов металлов предлагают импрегнировать ими повязки при хронических раневых инфекциях; однако недостатком такого метода является высокая концентрация металлов, необходимая для достижения эффекта.

*Использование бактериофагов.* Другим перспективным методом является использование бактериофагов. Основной ценностью этой стратегии является то, что, помимо влияния на биопленки, бактериофаги активны против мультирезистентных штаммов; так, доказана эффективность литических бактериофагов на мульти-резистентную инфекцию *P. aeruginosa* в моделях *in vivo* [57].

*Использование электрических импульсов или ультразвука.* Достаточно эффективными для диспергирования биопленок являются не только химические, но и физические методы, такие как ультразвук или электрические импульсы. Karosi et al. (2012) исследовали влияние низкочастотного ультразвука на биопленки при хроническом риносинусите и показали, что во всех случаях терапии достигалось уменьшение воспаления и полное уничтожение биопленки. Исследованы также антибиопленочные свойства ультразвука на моделях протезов суставов [58].

Электрические разряды, как показано J.L. Del Pozo et al. [59], оказывали антибактериальное влияние на некоторые виды бактерий и существенно



уменьшали количество жизнеспособных клеток в биопленках *P. aeruginosa*. Однако при этом открытым остается вопрос влияния таких методов терапии на ткани и иммунную систему макроорганизма.

**Применение сигнальных молекул распада биопленки.** Большой интерес вызвали не так давно открытые сигнальные молекулы распада биопленки *P. aeruginosa*, а именно цис-2-декановая кислота [60]. Такой сигнал синтезируется в модельных биопленках *P. aeruginosa* на поздних стадиях созревания (очевидно, при достижении критического количества клеток и истощении питательных веществ) и индуцирует распад и распространение биопленки. Показано, что при экзогенном внесении цис-2-декановой кислоты происходило диспергирование не только биопленок *P. aeruginosa*, но и других видов микроорганизмов (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*), то есть, очевидно, такой сигнал является общим для биопленкообразующих культур, независимо от вида.

В плане практического применения манипулирование цис-2-декановой кислотой могло бы вызывать контролируемый распад биопленок, координированный с антибиотикотерапией, или же наоборот, при использовании блокатора этого сигнала, предупреждать распространение биопленки на другие ткани организма [3].

**Комбинация нескольких типов антибиотиков.** Классическое применение антибиотиков, найденное неэффективным для использования в биопленках, также можно модифицировать с достижением положительной динамики. Таким подходом может быть одновременное применение нескольких типов антибиотиков, которые действуют на принципиально разные мишени бактериальной клетки и могут охватить метаболическое разнообразие гетерогенной популяции в биопленке.

Группой M.C. Walters et al. (2003) достигнут положительный эффект против биопленок *P. aeruginosa* при комбинированном использовании тобрамицина, цифрофлоксацина и тетрациклина, действующих на физиологически активные клетки в верхнем слое биопленки, и антибиотика колистина, способного влиять на метаболически неактивные клетки [39]. Положительный эффект дало также параллельное применение антибиотиков с детергентом ДСН и хелатирующим агентом ЕДТА [61].

**Комбинирование разных стратегий борьбы с биопленками.** В целом же, любая из рассмотренных стратегий терапии биопленки, будь то использование антиадгезивных или биоплеко-разрушающих препаратов, приводит к возвращению биопленочной культуры в планктонное состояние. В таком состоянии, как показали исследования, клетки часто «реверсируют» к высокому уровню чувствительности к антибиотикам, а потому могут поддаваться стандартным методам терапии.

Примером такой комбинированной терапии может быть одновременное применение альгинат-лиазы и ДНКазы, разрушающих матрикс биопленок *P. aeruginosa*, в сочетании с антибиотиком тобрамицином [62]. Показано, что такой подход намного увеличивает чувствительность биопленок к антибиотикам, а значит, требует менее продолжительной антибиотикотерапии и не дает возможности для селекции резистентных клеток и перехода инфекции в хроническую.

Таким образом, наиболее эффективной стратегией лечения инфекций, вызванных биопленками *P. aeruginosa*, остается комбинирование методов, специфически воздействующих на разные стадии развития биопленки с подобранной терапией одним или несколькими антибиотиками. Кроме того при практическом применении антимикробных агентов важно учитывать специфику биопленочных инфекций и не ограничиваться только данными МИК. Очевидно, что, ориентируясь на активные против биопленки концентрации того же действующего вещества, возможно достичь более разумного и эффективного использования препаратов в антимикробной терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bjarnsholt T. Biofilm infections. Springer. 2011. 314 p.
2. Davies JC. Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. Paediatr Respir Rev. 2002. Vol.3(2): 128-34.
3. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. / Ed. by J.L. Pace, M.E. Rupp, and G. Roger. Finch. CRC Press. 2005: 155-169.
4. Meluleni G.J., Grout M., Evans D.J., Pier G.B. Mucoid Pseudomonas aeruginosa growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. J Immunol. 1995. Vol.155(4): 2029-2038.
5. Ciofu O., Fussing V., Bagge N. et al. Characterization of paired mucoid/non-mucoid Pseudomonas aeruginosa isolates from Danish cystic fibrosis patients: antibiotic resistance,  $\beta$ -lactamase activity and RiboPrinting. J. Antimicrob. Chemother. 2001. Vol.48: 391-396.
6. Pritt B., O'Brien L., Winn W. Mucoid Pseudomonas in Cystic Fibrosis. Am J Clin Pathol. 2007. Vol.128: 32-34.
7. Japoni A., Farshad S., Alborzi A. Pseudomonas aeruginosa: Burn Infection, Treatment and

- Antibacterial Resistance. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2009. Vol.11: 244-253.
8. Chitkara Y.K., Feierabend T.C. Endogenous and exogenous infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a burns unit. *Int Surg*. 1981. Vol.66 (3): 237-40.
  9. Watters C., DeLeon K., Trivedi U. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice. *Med Microbiol Immunol*. 2013. Vol.202: 131-141.
  10. Hassan K.S., Al-Riyami D. Infective Endocarditis of the Aortic Valve caused by *Pseudomonas aeruginosa* and Treated Medically in a Patient on Haemodialysis. *SQU Med J*. 2012. Vol.12: 120-123.
  11. Jackson T.L., Reykyn S.J., Graham E.M. Endogenous Bacterial Endophthalmitis: A 17-year Prospective Series and Review of 267 Reported Cases. *Survey of Ophthalmology*. 2008. Vol.48: 403-423.
  12. Willcox M.D. *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear: a review. *Optom Vis Sci*. 2007. Vol.84: 273-278.
  13. McLaughlin-Borlace L., Stapleton F., Matheson M., Dart J.K. Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *JAP*. 1998. Vol,84: 827-838.
  14. Trampuz A., Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*. 2006. Vol.37: 59-66.
  15. Costerton J.W., Montanaro L., Arciola C.R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 2005. Vol.11: 1062-1068.
  16. *Catheter-Related Infections (Infectious Disease and Therapy)* / Ed. by H. Seifert, J. Bernd, B.M. Farr. Marcel Dekker. 2005. 519 p.
  17. Trampuz A., Widmer A.F. Infections associated with orthopedic implants. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2006. Vol.19: 349-356.
  18. Laffer R.R., Graber P., Ochsner P.E., Zimmerli W. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. *Clin Microbiol Infect*. 2006. Vol.12: 433-439.
  19. Floret N., Bertrand X., Touverez M., Talon D. Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*: origine exogène ou endogène de la bactérie responsable? *Pathologie&Biologie*. 2009. Vol.57: 9-12.
  20. Widmer A.F. Infection control and prevention in the ICU. *Intensive care medicine*. 1994. Vol.20: 7-11.
  21. Bergmans D.C., Bonten M.J., van Tiel F.H. Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax*. 1998. Vol.53: 1053-1058.
  22. Petignat C., Francioli P., Nahimana I. et al. Exogenous Sources of *Pseudomonas aeruginosa* in Intensive Care Unit Patients: Implementation of Infection Control Measures and Follow-Up With Molecular Typing. *infection control and hospital epidemiology*. 2006. Vol.27 (9): 953-957.
  23. Bodey G.RP., Bolivar R., Fainstein V., Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of infectious diseases*. 1983. Vol.5 (2): 279-313.
  24. Rocha C.L., Coburn J., Rucks E., Olson J. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S as a Bifunctional Enzyme in J774A.1 Macrophages. *Infection and immunity*. 2003. Vol.7: 5296-5305.
  25. Scharmann W. Cytotoxic effects of leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa* on polymorphonuclear leukocytes from cattle. *Infection and immunity*. 1976. Vol.3: 836-843.
  26. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000. Vol.54: 49-79.
  27. *Control of Biofilm infections by signal manipulation* / Ed. by N. Balaban. Springer. 2008. 173 p.
  28. Whiteley M., Bangera M.G., Bumgarner R.E. et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 2001. Vol.413: 860-862.

29. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001. Vol.55: 165-199.
30. Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev.* 2006. Vol. 30: 274-291.
31. Tomlin K.L., Coll O.P., Ceri H. Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Can J Microbiol.* 2001. Vol.47: 949-954.
32. Diggle S.P., Matthijs S., Wright V. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. *Chemistry&Biology.* 2007. Vol.14: 87-96.
33. Diggle S.P., Winzer K., Chabra S.R. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology.* 2003. Vol.80: 29-43.
34. Ganin H., Tang Xu., Meijler M. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by AI-2 analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2009. Vol.19: 3941-3944.
35. Charlton T.S., de Nys R, Netting A. et al. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ Microbiol.* 2000. Vol.2: 530-541.
36. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998. Vol. 280: 295-298.
37. Guo Q., Kong W., Jin S. PqsR-dependent and PqsR-independent regulation of motility and biofilm formation by PQS in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *JBM.* 2013. Vol.53: 1-11.
38. Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Fiandaca M.J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 2009. Vol.44: 547-558.
39. Walters M.C. 3rd, Roe F., Bugnicourt A. et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. Vol.47: 317-333.
40. Mah T.F., Pitts B., Pellock B. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* 2003. Vol. 426: 306-310.
41. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science .* 1999. Vol.284: 1318-1321.
42. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000. Vol. 406: 959-964.
43. Rossolini G., Mantegoni E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2005. Vol.11: 17-32.
44. Pankey G.A., Sabath L.D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clin Infect Dis.* 2004. Vol.38: 864-870.
45. Sepandj F., Ceri H., Gibb A. et al. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. *Perit Dial Int.* 2004. 24: 65-67
46. Mulcahy L.R., Isabella V.M., Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb. Ecol.* 2013. Vol.6: 76-79.
47. Schmidmaier G., Lucke M., Wildemann B. et al. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury.* 2006 . Vol.37: 105-112.
48. Bjarnsholt T., Kirketerp-Møller K., Kristiansen S. et al. Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS.* 2007. Vol. 115: 921-928.
49. Tre-Hardy M., Vanderbist F., Traore H. et al. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *Int. J of Antimicrobial Agents .* 2008. Vol.31: 329-336.
50. Muh U., Schuster M., Heim R. et al. Novel *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors Identified in an Ultra-High-Throughput Screen. *Antimicrob. Agents Chemother.*

2006. Vol.50: 3674-3679.
51. Wu H., Song Z., Hentzer M. et al. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004. Vol.53: 1054-1061.
  52. Ischida T., Ikeda T., Takiguchi N. et al. Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N-Acyl Cyclopentylamides. *Appl Environ Microbiol.* 2007. Vol.73: 3183-3188.
  53. Aiello D., Williams J., Majgier-Baranowska H. Discovery and Characterization of Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. Vol.54: 1988–1999.
  54. Alkawash M.A., Soothill J.S., Schiller N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS.* 2006 . Vol. 114: 131-138.
  55. Tetz G., Artemenko N., Tetz V. Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. Vol.53: 1204-1209.
  56. Teitzel G., Parsek M. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2003. Vol.69: 2313-2320.
  57. Fu W., Forster T., Mayer O. et al. Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* on Catheters in an In Vitro Model System. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. - Vol. 54: 397-404.
  58. Carmen J.C., Roeder B.L., Nelson J.L., Ogilvie R.L. et al. Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics. *Am J Infect Control.* 2005. Vol.33: 78-82.
  59. Del Pozo J.L., Rouse M.S., Patel R. Bioelectric effect and bacterial biofilms. A systematic review. *Int J Artif Organs.* 2008. Vol.31: 786-795.
  60. Davies D.G., Marques C.N. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol.* 2009. Vol.191: 1393-1403.
  61. Lambert R.J., Hanlon G.W., Denyer S.P. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2004. Vol.96: 244-253.
  62. Alipour M., Suntres Z.E., Omri A. Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2009. Vol. 64: 317-325.

*Поступила 20.10.2013*

*(Контактная информация: Шепелевич Виктория Владимировна - к.б.н., заведующая НИЛ «Мікробіологічних та імунологічних проблем біотехнології» «Микробиологических и иммунологических проблем биотехнологии» НУЦ «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Т.Г. Шевченка. 03164, г. Київ-164, ул. Генерала Наумова 37а, кв. 48, м.т. 0667817304, 0676825354; vshepelevich@ukr.net; Мележик Ирина Александровна - магистрант по специальности «Микробиология» Киевского национального университета им. Т.Г. Шевченка, НУЦ «Институт биологии»; 03164, г. Киев, ул. Ломоносова, 57; м.т. 0975490250; melezhik.i@gmail.com)*