

В чем секрет выживания патогенных бактерий в условиях воздействия антибактериальных препаратов?

Что такое биопленка?

С.В. Мальцев, д.м.н., профессор, Г.Ш. Мансурова,
Казанская государственная медицинская академия, РФ

Вплоть до конца прошлого века микробиология развивалась главным образом на основе исследований чистых культур микроорганизмов. В конце XX в. сформировалось представление об особой форме микрофлоры организма человека – хорошо организованном взаимодействующем сообществе микроорганизмов, покрывающих поверхности кишечной стенки, других слизистых оболочек, кожи и зубов человека.

→ Сегодня известно, что большинство бактерий существуют в природе не в виде свободно плавающих клеток, а в виде специфически организованных биопленок (biofilms), причем сами бактерии составляют лишь 5-35% массы биопленки, остальная часть – межбактериальный матрикс. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. Микрофлора биопленки более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы по сравнению со свободно плавающими бактериями; микроорганизмы, входящие в ее состав, оказались очень устойчивы к воздействию ультрафиолетового излучения, дегидратации, антибиотикам и факторам иммунной защиты. Примером защитной функции полимерной пленки является выживание *Salmonella* при хлорировании, что доказывает устойчивость биопленки к данному способу дезинфекции.

В природе биопленки распространены повсеместно. Их формирование отмечено у большинства бактерий в природных, клинических и промышленных условиях. Они образуются в условиях текучести на границе двух

средовых фаз (жидкость – жидкость, жидкость – воздух и т. д.). Биопленки обнаруживаются на твердых субстратах, погруженных в водный раствор, а также могут создавать плавающие маты на жидких поверхностях. Классическим примером биопленки может служить тонкое наложение на скалах, находящихся посреди течения. При достаточных ресурсах для роста биопленки быстро увеличиваются до макроскопических размеров. В биопленках может содержаться множество различных видов микроорганизмов, например бактерии, простейшие, грибы и водоросли; каждый из группы выполняет специализированные метаболические функции. P. Watnick и R. Kolter справедливо называют биопленки городами микробов.

Современная биотехнология позволяет успешно использовать оптимальное сообщество микроорганизмов для выполнения определенных функций. Это актуально в производстве продуктов, лекарств и пищевых добавок, утилизации отходов, нейтрализации загрязнений воды и почвы нефтепродуктами. Такие сообщества называют иногда консорциумами микроорганизмов. Практика показала многократное увеличение эффективности деятельности микроорганизмов при такой организации.

Биопленка – сообщество микробов, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфических генов. Это определение позволяет отличить микробные сообщества биопленок от похожих на них лишь внешне структур, например колоний бактерий, растущих на поверхности агара, которые не соответствуют характеристикам, свойственным истинной биопленке. Важно отметить, что бактерии, включенные в матрикс фрагментов, которые отрываются от биопленок на колонизированном медицинском устройстве и циркулируют в жидкостях тела, устойчиво проявляют все фенотипические характеристики исходной биопленки.

Основные свойства биопленки – взаимодействующая общность разных типов микроорганизмов (микроорганизмы собраны в микроколонии, которые окружены защитным матриксом и различаются по средам внутри; микроорганизмы имеют примитивную систему связи; микроорганизмы в биопленке устойчивы к антимикробным средствам и влиянию иммунной системы).

К настоящему времени достоверно доказана роль микробных биопленок в возникновении и развитии таких распространённых заболеваний, как инфекции, связанные с катетеризацией сосудов, вызванные *Staphylococcus aureus* и другими грамположительными микроорганизмами; инфекции сердечных клапанов и суставных протезов, вызываемые стафилококками; пародонтит, обусловленный ассоциациями микроорганизмов полости рта; инфекции мочевыводящих путей, обусловленные *E. coli* и другими патогенами; инфекции среднего уха (причина, например, *Haemophilus influenzae*); муковисцидоз, вызываемый *P. aeruginosa*, и другие хронические инфекции верхних дыхательных путей, мочеполового тракта и ЖКТ.

Все эти заболевания трудны для лечения, имеют высокую частоту рецидивов, некоторые из них могут явиться причиной летальных исходов. Далеко не до конца ясны механизмы, по которым микроорганизмы, образующие биопленки, вызывают патологические процессы в макроорганизме. Кроме тканей организма хозяина, микробные биопленки колонизируют различные медицинские устройства небиологической природы, внедряемые в организм человека (катетеры, водители ритма, сердечные клапаны, ортопедические устройства). Исследования имплантированных медицинских устройств с применением электронной микроскопии показали присутствие бактериальных биопленок.

При подозрении на формирование биопленки у пациента важно учитывать следующие моменты:

- наличие биопленок в кровотоке или мочевыводящем тракте может приводить к формированию эмболов;
- бактерии в биопленках могут обмениваться плазмидами резистентности к антибиотикам (передача резистентности от вида к виду);
- биопленки могут снижать чувствительность бактерий к антимикробным агентам;

- биопленки с грамотрицательными бактериями способны продуцировать эндотоксин, что может приводить к инфекционно-токсическому шоку;

- бактерии в биопленке не поддаются воздействию иммунной системы хозяина.

Многочисленные физиологические процессы, происходящие в биопленке, отличаются от физиологии чистых культур этих же бактерий. Соответственно, реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биопленке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре. Такая организация обеспечивает физиологическую и функциональную стабильность биопленки и является основой конкурентного выживания в экологической нише. Сообщество микроорганизмов организует единую генетическую систему в виде плазмид – кольцевых ДНК, несущих поведенческий код для членов биопленки, определяющих их пищевые (трофические), энергетические и другие связи между собой и внешним миром. Последнее получило специальное определение как социальное поведение микроорганизмов – *Quorum sensis*.

Феномен коллективного поведения бактерий впервые был описан около 20 лет назад, однако функции и роль системы *Quorum sensis*, которая обеспечивает социальное поведение бактерий, до сих пор остаются малоизученными и являются предметом крайне перспективного для медицинской практики научного поиска. В организме человека преимущество такой организации заключается в обеспечении гомеостаза органов, функциональность которых зависит от населяющих их микробов.

Исследования последних лет показали, что представители нормальной микрофлоры присутствуют в организме человека в виде фиксированных к определенным рецепторам микроколоний, заключенных в биопленку, которая, как перчатка, покрывает кожу и слизистые оболочки. Биопленка состоит из экзополисахаридов микробного

происхождения, микроколоний и муцина. Функционально она напоминает плаценту. Если последняя регулирует взаимоотношения плода и организма матери, то биопленка выполняет схожую роль, регулируя взаимоотношения между макроорганизмом и окружающей средой. Кроме того, микроорганизмы, входящие в состав биопленок, осуществляют многочисленные метаболические реакции, вовлекаясь в процессы синтеза и деградации как соединений, образуемых в организме хозяина, так и чужеродных субстанций; участвуют в процессах распознавания, абсорбции и транслокации как полезных, так и потенциально вредных агентов.

Как в любом микробиоценозе, в биопленках имеются постоянно обитающие виды бактерий (индигенная микрофлора) и транзиторные виды микробов. В состав кишечного содержимого входят представители 17 семейств, 45 родов и свыше 400 видов микроорганизмов, все они образуют сложнейшую по организации биопленку; этот факт заставляет нас, например, совершенно по-новому взглянуть на механизм возникновения и причины дисбактериоза кишечника, а также на способы его лечения. С этих позиций дисбактериоз нельзя рассматривать как колебания относительного содержания тех или иных видов микроорганизмов. Дисбактериоз кишечника представляет собой кардинальное нарушение строения биопленки слизистой толстого кишечника, а коллективный иммунитет патологической биопленки часто практически сводит на нет возможность коррекции дисбактериоза с помощью пробиотиков (препаратов живых культур основных микроорганизмов кишечника: бифидобактерий, лактобацилл, энтеробактерий и др.).

Таким образом, для практической медицины преимущество коллективного реагирования имеет и отрицательную сторону. Бактерии в биопленках демонстрируют повышенную выживаемость в присутствии агрессивных

веществ, факторов иммунной защиты и антибактериальных средств. Бактерии и грибы в биопленках выживают в присутствии антибиотиков; в частности, биопленки способны выдерживать концентрации антибиотиков, в 100-1000 раз превышающие терапевтические дозировки, для подавления одиночных бактериальных клеток. Поскольку свободные бактериальные клетки хуже защищены, чем биопленки, антибиотик, высокоактивный *in vitro* при тестировании в чистой культуре, при испытаниях *in vivo* (когда преобладает фенотип биопленок) может оказаться неэффективным. В этой связи одной из основных проблем практической медицины становится лечение заболеваний микробного происхождения в тех случаях, когда чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, ассоциированных в биопленку, не соответствует таковой, определенной в лабораторных тестах на клинических изолятах чистых культур бактерий. В связи с этим в последние годы идет активное изучение действия антибиотиков на биопленки бактерий, вызывающих патологические процессы различной локализации.

Считается доказанным, что биопленка повышает вирулентность и патогенность всех возбудителей. Подсчитано, что частота инфекций, обусловленных биопленкой, особенно в развитых странах мира, составляет 65-80%. Многие патогены, такие как *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria*, *Campylobacter*, существуют в форме биопленки на поверхности пищевых продуктов или оборудования для их хранения. Кроме того, патогенные бактерии, такие как *S. aureus*,

Enterococcus, *Streptococcus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, как правило, растут на катетерах, искусственных суставах, механических клапанах сердца и т. д. Активность биопленки была зарегистрирована при таких инфекциях, как кариес зубов, кистозный фиброз, инфекции мочевыводящих путей, эндокардит, отит, глазные и раневые инфекции. Продемонстрирована способность *H. pylori* формировать биопленку на слизистой оболочке желудка; таким образом, оптимальная антихеликобактерная терапия – это эрадикация биопленки *H. pylori*. Возрастающая антибиотикорезистентность и развитие бактериальных биопленок являются основными проблемами в лечении инфекций мочевыводящих путей.

В настоящее время идет интенсивное изучение причин такой удивительной устойчивости к антибиотикам у бактерий биопленок. Установлено, что в основе повышенной выживаемости лежат свойства клеток и внеклеточного матрикса. Матрикс биопленки может связывать или не пропускать и/или инактивировать антибиотики. Устойчивость, обусловленную свойствами клеток биопленки, объясняют уменьшением их свободной поверхности за счет контактов друг с другом и формированием особых бактерий, получивших название персистеров. Последние в силу дифференцировки временно становятся устойчивы практически ко всем антибактериальным препаратам. Основными механизмами повышения устойчивости бактерий к антибиотикам в биопленках являются ограничение проникновения антибиотиков через биопленки; ограничение питания и измененная

микросреда, обуславливающие уменьшение скорости деления бактерий, вследствие чего остается меньше мишеней для действия антибиотиков; адаптивные реакции; генная изменчивость персистирующих бактерий.

Антибиотики по действию на бактерии биопленок разделяются на два типа. К первому относят антибактериальные препараты, проникающие в биопленки и угнетающие или уничтожающие образующие их микроорганизмы. Второй тип – антибиотики, практически не проникающие в биопленки, но эффективно препятствующие их расселению за счет мигрирующих бактерий. Таким образом, некоторые антибиотики не проникают в биопленки и не уничтожают существующие сообщества, а только препятствуют увеличению их числа и распространению в организме человека. В связи с этим в последние годы началось изучение способности антибактериальных средств проникать в биопленки различных микробов. Установлено, что в биопленки *Klebsiella pneumoniae* плохо проникает ампициллин, а в сообщества *Enterococcus faecalis* – ампициллин, триметоприм/сульфаметоксазол и ванкомицин. В биопленки ряда микробов плохо проникает широко используемый амоксициллин.

К числу антибиотиков, хорошо проникающих через липиды клеток, относятся фторхинолоны. Антимикробные препараты этой группы способны действовать на основных возбудителей урологических заболеваний, в достаточной концентрации проникают в очаг инфекции. Имеющийся опыт использования антибиотиков свидетельствует о том, что с инфекционным

Доказано, что биопленки из сапрофитных бактерий играют важную защитную роль, препятствуя адгезии и колонизации слизистых оболочек патогенными бактериями. Бесконтрольное применение антибактериальных препаратов может привести к разрушению или изменению сапрофитной бактериальной биопленки и утрате устойчивости слизистых к патогенным бактериям.

процессом, прежде всего с его клиническими проявлениями, можно справиться с помощью антимикробных агентов, как проникающих, так и не проникающих в биопленки. Однако разница между ними существует, и она достаточно существенна. Показано, что различия антибиотиков, проникающих и не проникающих в биопленки, могут проявляться в отдаленных результатах лечения. Использование антибиотиков, плохо проникающих в биопленку, очень быстро приводит к формированию и отбору устойчивых штаммов. Кроме того, при этом чаще возникают рецидивы и формируются очаги хронических процессов.

Таким образом, очевидно, что повышение эффективности лечения невозможно без тестирования антибиотиков на способность проникать в биопленки, влиять на уже сформированные сообщества и угнетать их образование и расселение. Способность проникать в биопленки и действовать на расположенные внутри и расселяющиеся бактерии является крайне важным свойством антибиотиков, пока, к сожалению, недостаточно исследованным и малоизвестным практическим врачам. Изучена возможность некоторых препаратов, например кларитромицина, ингибировать образование гликокаликса, а также способность данного антибиотика в комбинации с цефалоспорином I поколения или ванкомицином препятствовать образованию биопленок на титановом медицинском оборудовании: структура биопленки изменяется, уменьшается количество альгината, гексозы, истончается гликокаликс, тем самым повышается проникновение антимикробного препарата.

Проводятся интенсивные исследования по изучению механизмов образования биопленки. Доктор N. Stanley-Wall исследовала гены и белки, необходимые для образования биопленки *Bacillus subtilis*. Она показала, в частности, что возможность образования биопленки определяет белок DegU. Показано, что белок SasG, располагающийся

на поверхности *S. aureus*, вместе с ионами цинка необходим для построения биопленки. РНК-связывающий белок CsgA штамма *E. coli* K-12 в зависимости от условий культивирования может быть как стимулятором, так и разрушителем биопленки путем воздействия на внутриклеточный биосинтез гликогена. Белок CsgD *E. coli* активирует рост фимбрий и синтез внеклеточных полисахаридов, способствуя формированию биопленки.

Исследователи из Института Пастера (г. Париж, Франция) в 2010 г. впервые показали, что некоторые вирусы, в частности ретровирус HTLV-1, способны образовывать комплексы, похожие на бактериальные биопленки. Благодаря биопленке вирусы защищены от влияния иммунной системы. Изучение образования вирусных биопленок может определить новую терапевтическую стратегию, которая будет ориентирована не только на вирус, но и на вирусную биопленку.

Представления о биопленках, подтвержденные с помощью современных методов визуализации, изменили взгляды на инфекционные заболевания. Все новые данные свидетельствуют о том, что хронические инфекции принципиально отличаются от острых образованием биопленок, а фагоциты макроорганизма не способны поглощать биопленки в отличие от отдельных бактериальных клеток. Существование биопленок при хронических инфекциях требует совершенно новых подходов к их диагностике и лечению. Повышает устойчивость биопленок к вредным факторам также присущее им генетическое и фенотипическое разнообразие, которое позволяет переносить большинство терапевтических воздействий. Кроме того, традиционные бактериологические методы не выявляют большинство бактерий, участвующих в инфекционном процессе.

Новейшие молекулярные, геномные, транскрипционные методы и методы протеомного анализа позволили

установить, что при выделении чистой культуры определяется лишь около 1% клеток патогенного микробиоценоза. В результате лечение нацелено лишь на 1-2 вида бактерий из множества штаммов, присутствующих в составе биопленки (в том числе, возможно, и грибов).

Сегодня не вызывает сомнений необходимость пересмотра концепции патогенеза различных хронических инфекций с учетом имеющихся данных о биопленках, что требует использования новых методов диагностики и лечения. Идентифицировать микроорганизмы в составе биопленок позволяют современные молекулярные методы: электрофорез в геле, высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентной гибридизацией *in situ*, эпифлуоресцентная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (CLSM), ПЦР с обратной транскриптазой и др.

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

Таким образом, лечение хронических инфекций в настоящее время уже не может основываться на традиционной концепции микробиологии. Новые представления о биопленках требуют изменения подходов к диагностике и лечению инфекций в самых различных областях медицины. ■

Статья печатается в сокращении.

Список литературы находится в редакции.

*Практическая медицина.
Педиатрия, 2011, № 5 (11)*