

Б.Г. Безродний, д.м.н., професор, **О.М. Петренко**, к.м.н., Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ

Біоплівки патогенних бактерій та їх роль у хронізації інфекційного процесу

Одноклітинним мікроорганізмам притаманні дві стратегії поведінки: вільне переміщення, плавання, при якому одиночні клітини вільно рухаються в рідкому середовищі; прикріплений стан, за якого клітини щільно прикріплені одна до одної та до поверхні. Основні дослідження біохімії, генетики, фізіології мікроорганізмів базувалися на вивченні бактеріальних популяцій, які складалися з окремих клітин або з колоній, вирощених з однієї клітини. З розвитком мікроскопічної техніки та молекулярно-генетичних методів дослідження було отримано докази того, що природні популяції бактерій існують у вигляді прикріплених на субстратах біоплівок, у складі яких бактерії здатні обмінюватися сигналами та проявляти скоординовану активність, яка властива багатоклітинним організмам.



Б.Г. Безродний



О.М. Петренко



Формування біоплівок є однією із стратегій виживання бактерій у займаних ними екологічних нішах. Перебуваючи у прикріпленому стані у складі біоплівок, бактерії захищені від шкідливих факторів навколишнього середовища та дії антибактеріальних речовин.

Згідно із сучасними уявленнями біоплівка — це безперервний шар бактеріальних клітин, які прикріплені одна до одної та до поверхні, закріплених біополімерним матриксом. Такі бактеріальні організації можуть бути утворені бактеріями одного або кількох видів. Вони можуть складатися як з активних функціонуючих клітин, так і зі «спочиваючих», або некультивованих форм. Біоплівки можуть бути утворені непатогенними та патогенними представниками мікрофлори шкіри, носоглотки, коменсалами й патогенами кишкової флори. Також біоплівки колонізують усі імпланти, які застосовують у медичній практиці, — катетери, імпланти і протези. Такий спосіб існування зумовлює численні проблеми в медичній практиці, оскільки встановлено, що формування біоплівок мікроорганізмами є однією з причин низки хронічних інфекцій. Морфологічна диференціація біоплівок відбувається у відповідь на дію таких факторів навколишнього середовища, як зміна температури, рН середовища, осмолярності, і супроводжується змінами метаболізму, гідродинаміки, комутативних зв'язків тощо. Складна архітектура біоплівок забезпечує можливість метаболічної кооперації клітин усередині систем, створює умови, які сприяють симбіотичній взаємодії між мікроорганізмами різних видів та захисту від зовнішніх чинників.

Утворення біоплівок є складним, багатостадійним процесом, який строго регулюється. Індивідуальні члени мають «специфічні обов'язки», які в комбінації з іншими посилюють життєздатність усього консорціуму. Міжклітинні комунікації в біоплівці відбуваються за участю механізму, що отримав назву «відчуття кворуму» (quorum sensing — QS). Обмін інформацією забезпечують спеціалізовані хімічні сигнальні молекули, завдяки яким мікробне співтовариство діє як єдиний організм [24].

У цьому огляді основну увагу буде приділено методам дослідження біоплівок, їх структурної організації, медичному значенню біологічних плівок як одного з механізмів формування хронічних вогнищ інфекції та розробці способів боротьби з біоплівками.

Методи вивчення біоплівок

Генетичні методи. Одним із доступних методів є культивування бактеріальних клітин у 96-луночних пластикових планшетах у умовах, які є найбільш оптимальними для певного виду мікроорганізмів. Метод заснований на здатності бактерій формувати біоплівки на поліхлорвініловому пластику. Фарбування біоплівки кристалфіолетом та кількісний підрахунок зв'язаного фарбника у спектрофотометрі дає змогу проводити кількісне порівняння здатності утворювати біоплівки різними мутантними штамами бактерій для генетичного контролю цього процесу [14, 18].

З метою визначення експресії генів у складі біоплівки застосовують генетичні конструкції, які являють собою злиття (fusion) промотора гена, що вивчають поряд з геном, який кодує зелений флуоресцентний білок (GFP), що дозволяє стежити за його експресією за допомогою епіфлуоресцентного або конфокального лазерного мікроскопа [9].

Зміни в метаболізмі бактерій при їх переході до прикріпленого способу життя вивчають шляхом порівняльного аналізу складу мРНК (транскриптомний аналіз) та білків (протеомний аналіз) у клітинах планктонних бактерій і бактерій біоплівок.

Мікроскопічні методи є основними методами вивчення структур товариства біоплівок. Останнім часом біоплівки досліджують за допомогою методів трансмісійної (ТЕМ) та скануючої (СЕМ) електронної мікроскопії, конфокальної лазерної скануючої мікроскопії (КЛСМ), атомно-силової мікроскопії (АСМ) [4].

На сьогодні прийнято модель біоплівки, створену на основі даних КЛСМ, згідно з якою остання складається із

грибоподібних утворень, що містять мікроколонії бактерій та екстраполімерний матрикс, через який проходять наповнені рідиною канали [10]. Згідно з КЛСМ бактеріальні плівки, що утворені різними видами мікроорганізмів, мають низку особливостей. Так, клітини в біоплівці мають щільну упаковку. Таке розташування клітин сприяє міжклітинному контакту та передачі міжклітинних сигналів, а також більш успішному процесу обміну генетичною інформацією. Другою особливістю біоплівки є наявність численних мембранних структур, що пронизують усю плівку. Можливо, ці структури забезпечують біоплівці додаткову щільність, яка необхідна для збереження її структурної цілісності.

Характерною особливістю бактерій у біоплівці є наявність мембранних везикул. Ці везикули містять протеазу, лужну фосфатазу, фосфоліпазу С та ферменти, які лізують пептидоглікан [6, 24]. Вважається, що основна функція везикул у біоплівці — лізис частини клітин, які є джерелом необхідних ростових факторів для інших членів мікробного товариства. Таким чином, мікроби демонструють модель «альтруїстичної поведінки» для виживання в цій екологічній ніші.

Завдяки КЛСМ стало можливим здійснювати безпосереднє спостереження за живими біоплівками. Для спостереження за процесом формування біоплівок за допомогою КЛСМ конструюють проточні камери — безперервно-проточні системи, через які постійним потоком пропускають поживне середовище. Через вікна в камері можна безпосередньо спостерігати за процесом утворення та розвитку біоплівки без її руйнування. Дослідження у проточних камерах показали, що біоплівка поліморфна та структурно адаптована до умов навколишнього середовища. Відомо, що зріла біоплівка через певний час руйнується, диспергується, що супроводжується планктонізацією [5, 21]. Через певний проміжок часу від біоплівки відділяються одиночні клітини та клітинні комплекси. У руйнуванні біоплівки беруть участь власні сурфактанти бактерій, альбінатлаза та інші полісахариди [23, 26].

Основні етапи формування біоплівки

Бактеріальна плівка формується внаслідок складної, чітко скоординованої взаємодії мікроорганізмів із поверхнею. Етапи формування біоплівок детально розглянуто в численних публікаціях [1, 4]. На сьогодні запропоновано дві моделі утворення біоплівок, які враховують рухомість і нерухомість бактерій.

У рухомих грамнегативних бактерій на початковому етапі вирішальна роль належить джгутикам, за допомогою яких мікроорганізми досягають поверхні. У *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ця послідовність процесів виглядає таким чином: початкове прикріплення до поверхні окремих клітин; утворення моношару клітин; рух по поверхні з утворенням мікроколоній та стимуляція утворення полісахаридного матриксу; дозрівання біоплівки частково за рахунок прикріплення до початкової біоплівки рухомих і нерухомих бактерій різних видів, які вільно плавають з формуванням тримірної структури дозрілої біоплівки (рис.).

Механізм утворення у нерухомих бактерій виглядає так. При контакті бактерії з поверхнею відбувається збільшення експресії поверхневих адгезинів, що сприяє прикріпленню до субстрату та міжклітинній взаємодії. У стафілококів, наприклад, таким адгезином є білок Вар та екзополісахариди РІА, які збільшують липкість клітин.

Кінцеве утворення біоплівки супроводжується формуванням екзополімерного матриксу — продукту життєдіяльності самих клітин та основного структурного компонента біоплівки [8, 10]. В еукаріот полісахариди формують поверхневий шар кліткової мембрани (глікокалікс). При дозріванні біоплівки продукується значна кількість екзополісахариду, який зв'язує сусідні клітини та формує матрикс. Екзополімерний субстрат (ЕПС), основним компонентом якого є полісахариди, становить 85% маси біоплівки, тоді як на бактерії припадає лише 15%.

Таким чином, бактерії в біоплівці занурені в полімерний матрикс, властивості якого визначають взаємодію мікробного товариства з навколишнім середовищем. ЕПС бере участь у взаємодії клітин із поверхнею, на якій знаходиться біоплівка, та сусідніми клітинами. Матрикс біоплівки розглядають як аніонний полімер. Матрикс у різних видів бактерій відрізняється за фізичними властивостями та хімічним складом. ЕПС матриксу представлений гомо- й гетерополісахаридами. До складу ЕПС входять уронові кислоти, головним чином глюкуронова, та аміноцукри. Наприклад, *Pseudomonas aeruginosa* утворює альгінат — сополімер маннууронової і глюкуронової кислот. Екзополімер *Escherichia coli* містить коланову кислоту [29]. Целюлозу утворюють різні види ентеробактерій. Целюлоза та агрегатні фімбрії — основний компонент біоплівок сальмонел [26]. Поряд з екзополісахаридами у складі матриксу виявлено білки, нуклеїнові кислоти, ліпополісахариди, лектини, мінерали, які необхідні для формування повноцінної біоплівки.

Функції матриксу різноманітні. Окрім каркасної, яка забезпечує стабільність біоплівки, основною функцією матриксу є протекторна. Матрикс захищає бактерії від негативних факторів навколишнього середовища, таких як УФ-радіація, радіація, зміни рН, осмотичний шок, висихання. ЕПС сорбує метали та мінерали, розчинені органічні речовини, концентрує поживні речовини, ферменти і фактори росту. Встановлено роль матриксу в утворенні полімікробних біоплівок. Нерідко у змішаних бактеріальних популяціях спостерігається утворення

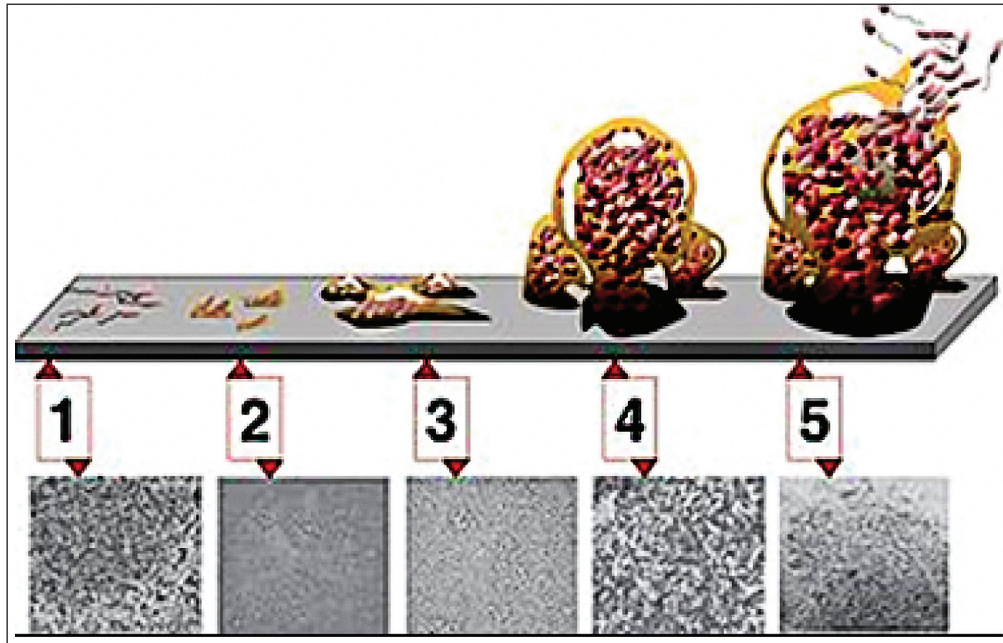


Рис. Стадії формування біоплівок у *Pseudomonas aeruginosa*

1 — первинне прикріплення клітин до поверхні; 2 — незворотне прикріплення; 3, 4 — стадії дозрівання; 5 — дисперсія біоплівки. Внизу кожному етапу проілюстровано з мікрофотографіями в КЛСМ.

Продовження на стор. 29.

Біоплівки патогенних бактерій та їх роль у хронізації інфекційного процесу

Продовження. Початок на стор. 25.

ко-агрегатів за рахунок злипання ЕПС. Конгрегація відіграє значну роль в існуванні бактеріальних систем. З одного боку, вона сприяє утворенню змішаних біоплівок, поєднаних на основі синергізму, з іншого — може «очищати» навколишнє середовище від патогенних бактерій при їх взаємодії з бактеріями-антагоністами.

Поряд з екзополісахаридами та білками екстрахромосомна ДНК (еДНК) є важливим компонентом матриксу біоплівки в різних бактеріальних видах. Встановлено, що вона утворюється як під час росту біоплівки одного виду, так і при формуванні біоплівок, утворених різними видами бактерій. Продемонстровано, що еДНК формується в результаті аутолізу клітин. Показано, що еДНК в біоплівці має сітчасту структуру, що може виконувати роль фіксуючого каркасу біоплівки. Однак головна її функція полягає в обміні генетичною інформацією внаслідок трансформації, а також використанні її клітин у якості джерела енергії при голодуванні [31].

Значення біоплівок у патогенезі хронічної інфекції

Встановлено, що розвиток багатьох хронічних інфекцій, а також інфекцій, виникнення яких пов'язане із застосуванням медичних імплантатів — лінз, катетерів, протезів, штучних клапанів серця, зумовлений бактеріями, що ростуть у вигляді біоплівок (табл.).

Якщо роль біоплівок у розвитку інфекцій, пов'язаних з імплантацією, очевидна, то зв'язок біоплівок з інфекціями, що виникають не внаслідок імплантації, не зовсім зрозуміла. Досі невідомо, яким чином відбувається формування біоплівки в умовах ранового дефекту та розвивається хронічне запалення, що уповільнює загоєння ран [11]. Так, на основі результатів електронної мікроскопії біоплатів ран встановлено, що біоплівки присутні у 60% зразків із хронічних ран та лише у 6% зразків із гострих ран.

Для формування мікроколоній у рані необхідно 2-4 год, для розвитку екстрацелюлярного мукополісахаридного матриксу та, звичайно, виникнення резистентності до дії біоцидів — лише 6-8 год. Формування дозрілої біоплівки потребує 2-4 доби, а її відновлення після часткового руйнування відбувається протягом 24 год [6, 8, 13, 25]. Цей факт пояснює необхідність ретельної обробки рани, різноманітність способів впливу на біоплівку, а головне — кратність обробок.

Таблиця. Перелік інфекційних захворювань, асоційованих з біоплівками	
Інфекція або захворювання	Бактерії-збудники, здатні до формування біоплівок
Карієс зубний	Грамполозитивні коки (<i>Streptococcus Spp</i>)
Періодонтит	Грамполозитивні анаеробні бактерії
Інфекції кістково-м'язової системи	Нетипові штами <i>Haemophilus influenzae</i>
Некритизуючі фасціїти	Грамполозитивні коки (<i>Staphylococci</i>)
Інфекції біліарного тракту	Стафілококи групи А
Остеомієліти	Кишені бактерії <i>Escherichia coli</i>
Бактеріальні простатити	Різні види бактерій та грибів
Ендокардити	<i>E. coli</i> та інші грамнегативні бактерії
Кістозно-фіброзна пневмонія	Різні групи стрептококів
Мелойдоза	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Внутрішньолікарняна інфекція	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Пневмонія у відділеннях інтенсивної терапії	Грамнегативні палички
Інфекції хірургічних швів Exit sites	<i>Staphylococcus epidermidis</i> та <i>S. aureus</i>
Артеріовенозні шунти	<i>Staphylococcus epidermidis</i> та <i>S. aureus</i>
Склерит	<i>Staphylococcus epidermidis</i> та <i>S. aureus</i>
Контактні лінзи	<i>Staphylococcus epidermidis</i> та <i>S. aureus</i>
Катетерні цистити	<i>Staphylococcus epidermidis</i> та <i>S. aureus</i>
Перитонеальні діалізи	Грамполозитивні коки
перитоніти	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> та грамполозитивні коки
Інфекції зумовлені в/маточними спіралями	<i>E. coli</i> та інші грамполозитивні коки
Ендотрахеальні трубки	Численні бактерії та гриби
Хікман-катетери	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Центральні венозні катетери	Численні бактерії та гриби
Штучні судини серця	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Судинні імплантати	<i>S. aureus</i> та <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Біліарні ендопротези	Грамполозитивні коки
Ортопедичні протези	Численні бактерії та гриби
	<i>S. aureus</i> та <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Клінічно побачити біоплівку неможливо. Навіть виявлення щільного нальоту на рані не завжди вказує на наявність біоплівки. Однак практика свідчить, що критична колонізація рани практично завжди корелює з наявністю бактеріальної біоплівки, а наявність ознак критичної колонізації умовно може вказувати на формування біоплівки. Низка мікроорганізмів, таких як *Pseudomonas aeruginosa*, продукують зелений пігмент, який можна побачити і на підставі цього запідозрити наявність біоплівки.

Сумісне існування мікроорганізмів дозволяє їм використовувати індивідуальну здатність для виживання всього бактеріального суспільства. Основною клінічною проблемою є стійкість бактерій біоплівки до антибактеріальних препаратів. Формування мукополісахаридного матриксу перешкоджає проникненню біоцидів до бактерій, стандартні пероральні дози антибіотиків можуть виявитися неефективними. Антибіотики, як правило, мають більшу молекулярну масу, що ускладнює їх потраплення до бактерій, більше того, утруднено проникнення антитіл і фагоцитів. У біоплівці відбувається трансферна передача генів, що забезпечує формування перехресної стійкості мікроорганізмів до антибактеріальних агентів. Крім того, більшість мікробних клітин в умовах біоплівки відчувають відносний дефіцит у живильних речовинах та кисні і перебувають у стані метаболічного сну, так званої гібернації, що визначає низьку ефективність антибіотиків. Слід зазначити, що формуванню біоплівок при цукровому діабеті також сприяють імунodefіцит та ішемія. Таким чином, цукровий діабет необхідно розглядати як стан, що зумовлює утворення біоплівок.

Інфекція, спричинена біоплівками, рідко може бути усунута імунною системою господаря: бактерії виділяють антигени, стимулюють продукцію антитіл та набувають стійкості до захисних механізмів. Навіть у практично здорових людей імунна система не здатна протистояти інфекціям, асоційованим з біоплівками [2].

У зв'язку з цим виникла необхідність розробки нових терапевтичних підходів до лікування бактеріальних інфекцій. Один із можливих способів вирішення цієї проблеми вчені вбачають у пошуку антипатогенних препаратів, які могли б, по-перше, знижувати або блокувати вірулентність бактерій, щоб з інфекцією змогла боротися імунна система організму; по-друге, були б здатними попереджати формування біоплівок чи забезпечувати їх руйнування. До основних напрямів розробки цієї проблеми належать:

- пошук антиадгезивних препаратів для імплантатів [39];
- використання сполучень, які пригнічують QS-систему та не діють на життєво важливі функції бактерій і таким чином не послаблюють їх ріст. Можна також очікувати, що QSI не впливатимуть на представників нормальної мікрофлори, що присутні в організмі людини [3];
- пошук фізичних способів боротьби (застосування лазера, холодної плазми, пов'язок) [32];
- пошук речовин, які руйнують матрикс біоплівки, тим самим сприяючи доступу антибактеріальних препаратів до клітин [4];
- конструювання фагів а la carte (конструювання генно-інженерних фагів, які мають розширений літичний спектр та несуть гени, що здатні руйнувати матрикс — полісахариди, протеази, ДНКазу) [2];
- комбінована дія різними методами (антибіотики та фактори, які руйнують матрикс) [35, 36].

Висновки

Біоплівки є високоорганізованими бактеріальними асоціаціями, що утворюються бактеріями одного чи декількох видів, які можуть бути як активними, так і перебувати у стані спокою. Нині відомо, що бактеріальні клітини, які інтегровані в біоплівки, підлягають структурним змінам для кращого прикріплення до поверхні, мають різну функціональну активність генів, що зумовлено колективним існуванням, на відміну від вільно існуючих, планктонних мікроорганізмів. Необхідність особливо щільної упаковки може супроводжуватися змінами їх форми та ультраструктури. Для формування та існування біоплівки необхідні міжклітинні взаємодії та комунікації, які забезпечуються сигнальними молекулами чи аутоіндукторами у відповідь на зміни навколишнього середовища. Таким чином, у складі біоплівок бактерії демонструють ознаки соціальної поведінки.

Вивчення біоплівок та сигнальних генетичних систем, що регулюють їх формування, має зробити значний внесок у пошук засобів профілактики та захисту від патогенів, створення нового класу антимікробних препаратів.

Література

1. Бондаренко В.М. Механизмы формирования патогенности оппортунистическими микроорганизмами / В.М. Бондаренко // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. — М., 2010. — С. 42-43.
2. Бехало В.А. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток, входящих в состав «медицинских биопленок» / В.А. Бехало, В.М. Бондаренко, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Микробиология. — 2010. — № 4. — С. 97-107.
3. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации / В.М. Бондаренко. — Тверь: Триада, 2011. — 88 с.
4. Елинов Н.П. Структурированные и неструктурированные формы существования микромицетов в искусственных и естественных условиях / Н.П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. — 2009. — Т. 11, № 3. — С. 3-9.
5. Ерюхин И.А. Хирургические инфекции: руководство / И.А. Ерюхин, В.А. Хрупкин, В.М. Бадиков. — СПб.: Питер, 2003. — Гл. 4. Раневая инфекция. — С. 213-262.
6. 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.
7. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. — СПб.: Фолиант, 2008. — 552 с.
8. Пинчук Л.М. Молекулярная мимикрия как фактор патогенности микроорганизмов / Л.М. Пинчук // Успехи современной биологии. — 1992. — Т. 112, № 2. — С. 225-237.
9. Романова Ю.М. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками / Ю.М. Романова, Л.В. Диденко, Э.Р. Толордава // Вестник Российской АМН. — 2011. — № 10. — С. 31-38.
10. Рыбальченко О.В. Атлас ультраструктуры микробиоты кишечника человека / О.В. Рыбальченко, В.М. Бондаренко, В.П. Добрица. — СПб.: ИИЦ ВМА, 2008. — 112 с.
11. Andriessen A.E. Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds / A.E. Andriessen, T. Eberlein // Wounds. — 2008. — Vol. 20, № 6. — P. 171-175.
12. Bester E. Metabolic differentiation in biofilms as indicated by carbon dioxide production rates / E. Bester [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — Vol. 76, № 4. — P. 1189-1197.
13. Bjarnsholt T. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis / T. Bjarnsholt [et al.] // Wound Repair Regen. — 2008. — Vol. 16, № 1. — P. 2-10.
14. Conley J. Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? / J. Conley [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, № 9. — P. 4043-4048.
15. Costerton J.W. Microbial biofilms / J.W. Costerton [et al.] // Ann. Rev. Microbiol. — 1995. — Vol. 49. — P. 711-745.
16. Dietrich L.E. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa* / L.E. Dietrich [et al.] // Mol. Microbiol. — 2006. — Vol. 61, № 5. — P. 1308-1321.
17. 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.
18. Edwards R. Bacteria and wound healing / R. Edwards, K.G. Harding // Curr. Opin. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 17, № 2. — P. 91-96.
19. European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Wound Bed Preparation in Practice. — London: MEP Ltd, 2004.
20. 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, № 22. — P. 7945-7947.
21. Guiot E. Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two photon excitation / E. Guiot [et al.] // Photochem. Photobiol. — 2002. — Vol. 75, № 6. — P. 570-579.
22. Hall-Stoodley L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cell Microbiol. — 2009. — Vol. 11, № 7. — P. 1034-1043.
23. Hibbing M.E. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle / M.E. Hibbing, C. Fuqua, M.R. Parsek, S.B. Peterson // Nat. Rev. Microbiol. — 2010. — Vol. 8, № 1. — P. 15-25.
24. Hurlow J. Clinical experience with wound biofilm and management: a case series / J. Hurlow, P.G. Bowler // Ostomy Wound Manage. — 2009. — Vol. 55, № 4. — P. 38-49.
25. James G.A. Biofilms in chronic wounds / G.A. James [et al.] // Wound Repair Regen. — 2008. — Vol. 16, № 1. — P. 37-44.
26. Kaerberlein T. Isolating «uncultivable» microorganisms in pure culture in a simulated natural environment / T. Kaerberlein, K. Lewis, S.S. Epstein // Science. — 2002. — Vol. 296, № 5570. — P. 1127-1129.
27. Kaehn K. In-vitro test for comparing the efficacy of wound rinsing solutions / K. Kaehn, T. Eberlein // Br. J. Nurs. — 2009. — Vol. 18, № 11. — P. 4-10.
28. Koseoglu H. Ultrastructural stages of biofilm development of *Escherichia coli* on urethral catheters and effects of antibiotics on biofilm formation / H. Koseoglu [et al.] // Urology. — 2006. — Vol. 68, № 5. — P. 942-946.
29. Liu Y. Role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of *Escherichia coli* in porous media / Y. Liu, J. Li // Environ. Scien. Technol. — 2008. — Vol. 42, № 2. — P. 443-449.
30. Stoodley P. Biofilms as complex differentiated communities / P. Stoodley, K. Sauer, D.G. Davies, J.W. Costerton // Annual Rev. Microbiol. — 2002. — Vol. 56. — P. 187-209.
31. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework / I. Sutherland // Microbiology. — 2001. — Vol. 147, Pt. 1. — P. 3-9.
32. Vowden K.R. Wound debridement, Part 1: non-sharp techniques / K.R. Vowden, P. Vowden // J. Wound Care. — 1999. — Vol. 8, № 5. — P. 237-240.
33. Vowden K.R. Wound debridement, Part 2: sharp techniques / K.R. Vowden, P. Vowden // J. Wound Care. — 1999. — Vol. 8, № 6. — P. 291-294.
34. Weigel L.M. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm / L.M. Weigel [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 2007. — Vol. 51, № 1. — P. 231-238.
35. Wolcott R.D. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds / R.D. Wolcott, J.P. Kennedy, S.E. Dowd // J. Wound Care. — 2009. — Vol. 18, № 2. — P. 54-56.
36. Wolcott R.D. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm / R.D. Wolcott [et al.] // J. Wound Care. — 2010. — Vol. 19, № 2. — P. 45-50, 52-53.
37. Wolcott R.D. A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia / R.D. Wolcott, D.D. Rhoads // J. Wound Care. — 2008. — Vol. 17, № 4. — P. 145-155.
38. Xavier J.B. Cooperation and conflict in microbial biofilms / J.B. Xavier, K.R. Foster // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104, № 3. — P. 876-881.
39. Ziebuhr W. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen / W. Ziebuhr [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2006. — Vol. 28, Suppl. 1. — P. 14-20.