

Биоплёнки и методы их воспроизведения в эксперименте

А. Д. ДАУДОВА, Ю. З. ДЕМИНА, О. В. РУБАЛЬСКИЙ, *А. Л. ЯСЕНЯВСКАЯ

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

Резюме

С момента выделения чистой культуры возбудителя Р. Кохом и формулировки им постулатов, отражающих роль микроорганизма в развитии инфекционных заболеваний, основным объектом исследования являлись и до настоящего времени остаются в большинстве случаев изолированные бактерии, их морфологические, биохимические, генетические свойства. В отношении планктонных, свободных клеток изучаются также фармакокинетические и фармакодинамические свойства соединений с потенциальной антибактериальной активностью. В последние годы по мере накопления знаний и обнаружения новых инфекций и состояний, в которых участвуют особым образом организованные сообщества микробов — биоплёнки, меняется подход к диагностике и терапии инфекционных заболеваний, особенно с хроническим течением. В связи с этим совершенствование, разработка новых репрезентативных моделей микробных консорциумов как *in vitro*, так и *in vivo* чрезвычайно актуальны. Вкупе с современными методами исследования это позволит углубить познания в области закономерностей формирования, построения, функционирования микробного мира в определённой экологической нише, отработать инновационные подходы к терапии биоплёночных инфекций, обнаружить новые таргетные точки воздействия antimicrobных препаратов в отношении не отдельных бактерий, а многогранного микробного консорциума. В обзоре представлены основные подходы к воспроизведению биоплёночных инфекций в эксперименте в условиях *in vitro* и *in vivo*, их преимущества, недостатки и возможные перспективы повышения релевантности и валидности моделей.

Ключевые слова: биоплёнка; бактерии; методы исследования биоплёнки

Для цитирования: Даудова А. Д., Демина Ю. З., Рубальский О. В., Ясенявская А. Л. Биоплёнки и методы их воспроизведения в эксперименте. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024; 69 (11–12): 85–92. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-85-92>. EDN: SRKNBR.

Biofilms and Methods of Their Reproduction in the Experiment

ADILYA D. DAUDOVA, YULIYA Z. DEMINA, OLEG V. RUBALSKY, *ANNA L. YASENYAVSKAYA

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

Abstract

Isolated bacteria, their morphological, biochemical, and genetic properties are, to this day, the main object of research since the isolation of a pure culture of the pathogen by R. Koch and his formulation of the postulates reflecting the role of the microorganism in the development of infectious diseases. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of compounds with potential antibacterial activity are also studied in relation to planktonic, free cells. In recent years, as knowledge accumulates and new infections and conditions involving specially organized microbial communities — biofilms — are discovered, the approach to the diagnosis and treatment of infectious diseases, especially those with a chronic course, is changing. In this regard, the improvement and development of new representative models of microbial consortia both *in vitro* and *in vivo* are extremely relevant. Along with modern research methods, this will allow us to deepen our knowledge of the patterns of formation, construction, and functioning of the microbial world in a specific ecological niche, to develop innovative approaches to the treatment of biofilm infections, and to discover new target points for the action of antimicrobial drugs, directed at a multifaceted microbial consortium instead of individual bacteria. The review presents the main approaches to reproducing biofilm infections *in vitro* and *in vivo* experiments, highlighting their advantages, disadvantages, and possible prospects for increasing the relevance and validity of the models.

Keywords: biofilms, bacteria, biofilm research methods

For citation: Daudova A. D., Demina Yu. Z., Rubalsky O. V., Yasyenyavskaya A. L. Biofilms and methods of their reproduction in the experiment. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 85–92. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-85-92>. EDN: SRKNBR. (in Russian)

Одной из основных задач медицинской микробиологии является выделение и идентификация этиологического агента, поиск эффектив-

ных методов его элиминации из макроорганизма и профилактика дальнейшего распространения.

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: yasen_9@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: yasen_9@mail.ru

EDN: SRKNBR



В 1881 г. Робертом Кохом была опубликована статья «Методы изучения патогенных организмов», в которой автором был описан метод выделения чистой культуры возбудителя, основанный на механическом разобщении бактериальных клеток [1]. Таким образом в истории микробиологии было положено начало «периода чистой культуры». Изучение этиологии инфекционных заболеваний вплоть до настоящего времени осуществляется на основе определения чистых культур микроорганизмов, выделенных из патологического очага, и составляет основу бактериологического метода исследования.

Однако рост отдельных планктонных бактерий в среде, богатой питательными веществами, существенно отличается от их существования в естественных условиях, в том числе в организме человека. Обычно планктонный фенотип бактерий встречается транзиторно и в минимальном количестве, как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой. Бактериальные популяции в организме больного представляют собой преимущественно биоплёнки — полимикробные фиксированные сообщества, внедрённые в синтезированный ими полимерный матрикс [2, 3].

Посредством современных молекулярных, геномных, транскриптомных и протеомных методов исследования удалось показать, 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 биоплёнки [4, 5]. Наличие жизнеспособных, но некультивируемых микробов приводит в ряде случаев к ошибочному или неполному диагнозу. Не исключено заключение о «стерильном воспалении» или вирусной инфекции.

Биоплёнки — это основной фенотип большинства бактерий в естественных условиях обитания как во внешней среде, так и в организме человека. При этом сами бактерии составляют лишь 5–35% массы биоплёнки, остальная часть — межбактериальный неоднородный в химическом отношении матрикс.

Экстрацеллюлярный слой содержит до 40–95% полисахаридов. Концентрация других химических компонентов сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов до 40% и нуклеиновых кислот 1–20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, так как 80–90% объёма биоплёнки занимает вода. Бактериальный матрикс обладает собственной системой микроциркуляции, которая позволяет поступать вглубь биоплёнки и циркулировать в ней питательным веществам, кислороду, углекислому газу, ферментам, сигнальным метаболитам, а также ответственна за выведение продуктов ме-

таболизма бактериальных клеток. Снаружи матрикс биоплёнки покрывает поверхностная оболочка, основным элементом которой является трёхслойная мембрана. Поверхностная оболочка выполняют барьерную функцию, защищает микробные сообщества от действия окружающей среды, а также придаёт биоплёнке прочность.

Сообщество биоплёнок может быть сформировано из одного вида микроорганизмов или включать комплекс различных видов бактерий, грибов, водорослей и т. д. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. Микрофлора биоплёнки более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы по сравнению со свободно плавающими бактериями. Сессильные микробы приобретают устойчивость к воздействию ультрафиолетового излучения, дегидратации, вирусам, антибиотикам и факторам резистентности макроорганизма [6, 7]. Ингибирующая концентрация антибиотиков для бактерий, входящих в состав биоплёнок, в 100–1000 раз выше в сравнении с планктонными клетками [8–10].

Известны следующие механизмы защиты микроорганизмов в условиях биоплёнки:

— блокировка, которую осуществляет полисахаридный матрикс, синтезированный микроорганизмами микробного сообщества, препятствуя проникновению эндогенных и экзогенных факторов защиты;

— взаимная защита, которая обеспечивается самими микроорганизмами, входящими в состав биоплёнки, когда они обеспечивают собственными защитными механизмами всех «жителей микробного города»: защитные ферменты, антибиотик-связывающие белки, обмен плазмидами;

— «бездействие» или снижение метаболической активности. Данная стратегия выживания обусловлена тем, что большинство антибактериальных механизмов направлено на активные процессы метаболизма микробов.

Многочисленные физиологические процессы, происходящие в биоплёнке, отличаются от физиологии чистых культур этих же бактерий. Реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биоплёнке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре. Такая организация обеспечивает её физиологическую и функциональную стабильность и является основой конкурентного выживания в экологической нише [11].

Термин «биоплёнка» в отношении фиксированных микробных сообществ был введён в 1981 г., но бактериальная агрегация наблюдалась и считалась важной для функционирования консор-

циумов гораздо ранее [12, 13]. Так, наблюдения, связывающие этиологию персистирующей (хронической) инфекции с агрегацией бактерий, были зарегистрированы в 1970 годах в лёгких пациентов, страдающих от муковисцидоза (МВ). Агрегированные бактерии наблюдались в мокроте пациентов с МВ, хронически инфицированных мукоидными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* [14, 15].

В 1995 г. биоплёнки были определены J. W. Costerton и соавт. [16] как «структурированное сообщество клеток бактерий, заключённых в полимерную матрицу собственного производства, прикреплённую к поверхности».

По мере накопления знаний и обнаружения новых инфекций и состояний, в которых участвуют особым образом организованные скопления микробов представление о биоплёнке меняется. Например, было обнаружено, что патогенные агрегаты биоплёнки могут образовываться без прикрепления к поверхности и что матрица биоплёнки не обязательно должна быть выработана бактериями самой биоплёнки [17]. На формирование структуры влияют доступность питательных веществ, кислорода и другие условия окружающей среды. Архитектоника 3D-микроролоний биоплёнок находится в зависимости от источника углерода [18].

Недавние геномные и протеомные исследования идентифицировали многие гены и генные продукты, дифференциально экспрессирующиеся во время формирования биоплёнок, раскрывая сложность развития этого процесса [19]. Предполагается, что переключение режима мобильности бактериальных клеток от планктонных до sessильных является сложным и строго регулируемым процессом, определяемым генетическим кодом. Рассеивание клеток и небольших микробных агрегатов на последней стадии развития биоплёнки также, по мнению ряда авторов, считается генетически запрограммированным процессом [19, 20].

По результатам ряда исследований было обнаружено, что общей схемы экспрессии генов для биоплёнок планктонного и sessильного типов пока не выявлено. Различные гены регулируются в сторону активации или репрессии в количестве, варьирующем от 1 до 38% от общего генома. Подобная вариабельность результатов может быть связана с различиями в видовом составе биоплёнок, в экспериментальных сценариях, а также с тем, что микрочипы ДНК, обладая высокой чувствительностью, обеспечивают считывание информации только в определённый временной промежуток [21–24].

Наличие последовательностей бактериального генома вместе с разработкой микрочипов, детектирующих экспрессию генов микроорганизмов, позволяет не только произвести сравнитель-

ный анализ преобразования наследственной информации в функциональные продукты у бактерий, выращенных в различных условиях, но и определить в дальнейшем терапевтические мишени для борьбы с биоплёнками.

Несмотря на то, что первые публикации об агрегации бактерий были результатом наблюдения *in vivo*, более поздние знания о процессах развития медицинских биоплёнок в значительной степени были получены благодаря использованию систем поверхностного роста *in vitro*.

Методологический подход к изучению биоплёнок *in vitro* подразумевает 2 основных направления: статический и динамический, имитирующий создание условий, приближённых к естественным.

Культивирование биоплёнок в статических условиях подразумевает использование 96-луночных микротитровальных планшетов в различных модификациях. После инокуляции в лунки бактериальной суспензии и культивирования в благоприятных условиях производят удаление планктонных бактерий и индикацию биоплёнки различными способами. К преимуществам данной методики следует отнести доступность и простоту воспроизведения, наглядность и высокую производительность. Однако в настоящее время отсутствуют единые стандарты применения этого метода в различных лабораториях. Адгезивная способность микробов, инициирующая начальные этапы формирования биоплёнок, зависит не только от структурно-морфологических особенностей организмов, но и от физико-химических свойств биотических и абиотических экспериментальных поверхностей, а также состава, осмолярности питательных сред и степени аэрации [25].

ALI-метод (air-liquid interface) подразумевает культивирование биоплёнок в планшетах, расположенных под углом 30–50°. Детекция биоплёнок производится без использования красителей, с применением фазово-контрастной микроскопии, в режиме реального времени. К недостаткам следует отнести необходимость постоянного контроля уровня питательной среды либо продолжительности культивирования для избежания высыхания зоны соприкосновения биоплёнки с поверхностью лунки [25].

Метод гидроксипатитных поликарбанатных дисков является разновидностью статического метода. Диски с поверхностно нанесённой бактериальной суспензией помещаются на поверхность плотной питательной среды. Через поры дисков питательные вещества поступают к микробам. Метод рекомендован авторами для изучения антимикробной активности препаратов [26].

J. H. Merritt и соавт. [26] предложили использовать 6-луночные планшеты, с индивидуальной подачей и отводом питательной среды из каждой лунки. Метод занимает промежуточное положение

между статическими и динамическими методами культивирования биоплёнок.

Более комплексные исследования роста биоплёнки возможны с использованием динамических систем (ферментёры, аппарат Робинсона), когда планктонная форма микроба помещается в жидкую питательную среду, циркулирующую в закрытой системе.

При проточном (микроциркуляторном) методе биоплёнка микроорганизмов образуется на поверхности силиконовых трубок проточных ячеек (flow cells), через которые с помощью помпы постоянно подаётся питательная среда. Метод ценен при воспроизведении процесса биоплёнообразования на абиотических поверхностях, например, на внутрисосудистых катетерах [27].

Реакторы с капельным потоком предназначены для исследования биоплёнок, выращенных в условиях низкого сдвига. Реактор с капельным потоком состоит из четырёх параллельных тестовых каналов, каждый из которых способен вместить один образец стандартного размера для предметного стёкла микроскопа. Реактор с капельным потоком подходит для общих исследований биоплёнок, криосекции образцов биоплёнок, высокой выработки биомассы, оценки медицинских материалов и постоянного тестирования медицинских устройств [28]. Использование данного технологического процесса оптимально для изучения как одиночных, так и многовидовых биоплёнок с капельным течением и предлагает платформу для фундаментальных исследований образования биоплёнок, взаимодействия микроб-микроб и коррозии под воздействием микроорганизмов. Визуализация достигается за счёт применения лазерной десорбционно-ионизационной масс-спектрометрии, масс-спектрометрии вторичных ионов и сканирующей электронной микроскопии [29].

Реактор с вращающимся диском состоит из тефлонового диска с углублениями для съёмных ёмкостей (ячеек). В нижней части вращающегося диска находится стержневой магнит, позволяющий вращению диска создавать сдвиг поверхности жидкости. Весь диск, содержащий 18 образцов, помещают в стеклянный реактор объёмом 1000 мл. Жидкая питательная среда циркулирует по сосуду, в то время как диск вращается магнитной мешалкой. Ёмкости (ячейки) извлекаются из корпуса реактора, биоплёнки соскабливаются для дальнейшего изучения или получения изображения под микроскопом. Вращающиеся дисковые реакторы предназначены для лабораторных оценок эффективности биоцидов, удаления биоплёнок и характеристик противообрастающих материалов [30].

Размеры биоплёнки *in vitro* варьируют от приблизительно 1 см² в статическом анализе микротитровальных планшетов до 10 см² в проточных

ячейках. Толщина бактериальных биоплёнок, прикреплённых к стабильной поверхности, может достигать 300 мкм. Во всех случаях верхний слой биоплёнки подвергается либо воздействию атмосферного воздуха, либо непрерывной подаче жидкой среды, что значительно отличается от условий в организме-хозяине.

В динамических системах осуществляется постоянное поступление питательных веществ и удаление продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, что интенсифицирует процесс биоплёнообразования. Важно отметить, что условия формирования биоплёнки в этом случае стандартизованы. Однако сложная конструкция оборудования, большие объёмы питательных сред, высокие экономические затраты по его обслуживанию, затруднение стерилизации внутренних поверхностей аппаратов, низкая производительность ограничивают их использование. Несмотря на создание в динамических системах условий, максимально приближенных к естественным условиям обитания микробов, они не способны в полной мере отражать влияние факторов внешней среды и особенности взаимодействия с макроорганизмом [25, 31].

Хотя все вышеперечисленные системы *in vitro* могут использоваться для тестирования эффектов простых параметров на структуру и рост биоплёнки, они не способны имитировать сложность среды хозяина.

Причиной острых бактериальных инфекций обычно являются планктонные бактерии и, как правило, они успешно поддаются лечению антибиотиками и другими антибактериальными препаратами. Однако известно, что более 70% инфекционных заболеваний человека сопровождаются образованием биоплёнок [32]. В этих случаях формирование персистеров в микробных сообществах приводит к хронизации процесса, развитию лекарственной устойчивости, возможным неблагоприятным исходам заболеваний.

Очевидно, что большинство текущих гипотез о закономерностях образования, архитектоники и распространения биоплёнок, формирования устойчивости к антибиотикам в значительной мере базируются на наблюдениях за *in vitro*-биоплёнками. Экстраполировать полученные сведения в абсолюте на значительно более сложно устроенную среду *host*-организма, с которой сталкиваются патогенные бактерии при хронических биоплёночных инфекциях с их генотипическими и фенотипическими изменениями не представляется возможным. Важная связь между *in vitro* и инфекционными биоплёнками может быть установлена на основе соответствия между наблюдениями за биоплёнкой «на стекле» и в репрезентативных животных моделях, где при сохранении динамического взаимодействия с макроорганиз-

мом возможна комплексная оценка значительно большего числа параметров [17].

Для изучения свойств биоплёнок и микробов, их образующих, создано немало моделей на животных. Удалось имитировать такие заболевания, как кариес, эндокардит, пневмония, кератит, средний отит [33], муковисцидоз [34–36], хронические раневые инфекции [37] и инфекции, связанные с имплантатами [38, 39].

Основным преимуществом использования моделей на животных для изучения медицинских биоплёнок является наличие макросреды среды организма-хозяина, включая наличие компонентов защитных сил организма и других сложных биологических систем, которые невозможно воспроизвести в условиях *in vitro*.

Для воспроизведения биоплёнки *in vivo* используют различных животных — от коз и шиншиллы до крыс и мышей. Ряд исследователей отдают предпочтение крупным животным, полагая, что их физиологические параметры могут быть приближены к таковым у организма человека. Грызуны, особенно мыши, являются наиболее востребованными видами в моделях инфекций, учитывая относительно низкую стоимость приобретения и содержания этих животных, вариативность экспериментальных доступов и воспроизводимость моделей. Следует отметить, что, по мнению некоторых учёных, у разных инбредных штаммов мышей течение одной и той же инфекции, как и иммунологический ответ на один и тот же инфекционный агент также могут отличаться [40–42].

При выборе инфекционного агента учитывается его релевантность для исследуемой биоплёночной инфекции. Так, например, *Pseudomonas aeruginosa* используется для создания модели хронической лёгочной инфекции или раневой инфекции, *Staphylococcus aureus* — в моделях ортопедической аллопластической инфекции. Модель должна быть воспроизводимой, а формирующаяся биоплёнка должна быть доступна для идентификации. Многие модели животных включают либо структурное повреждение, такое как создание раны на коже животного для хронических моделей ран, либо имплантацию инородного тела как в ортопедических аллопластических моделях [43, 44].

Так, например, модель хронической инфекции лёгких воспроизводили на самках мышей BALB/c. Гранулы альгината морских водорослей с внедрённым в них *P. aeruginosa* PAO579 помещали в левое лёгкое мышей BALB/c с помощью иглы с шариком на конце посредством трахеотомии. Гомогенат лёгких по итогам эксперимента подвергали количественным бактериологическим методам исследования [45].

Для модели хронической раневой инфекции в качестве экспериментальных животных исполь-

зовали самок мышей C3H/HeN или BALB/c. Животных подвергали термическому воздействию до возникновения ожога третьей степени. Подкожно вводили раствор, содержащий *P. aeruginosa* PAO1. Мазки из-под струпов брались сразу после умерщвления мышей и высеивались на модифицированную среду Конради–Дригальского, селективную для грамотрицательных палочек [46].

Модель хронического остеомиелита была инициирована на инбредных мышах C57BL/6 посредством транстибиальной имплантации булавки из нержавеющей стали, несущей на своей поверхности различные штаммы *S. aureus* (M2 и USA300 LAC) [47].

Несмотря на стремление учёных воспроизвести в организме экспериментальных животных, условий, имитирующих хроническую инфекцию, это не всегда оказывается возможным. Причиной, в частности, является необходимая долгосрочность исследования. Так, например, в лёгких человека противостояние микроба и организма-хозяина при муковисцидозе может длиться до 30 лет и приводить к возникновению новых фенотипических и генотипических вариантов инфицирующих бактерий [48]. Разработанные на сегодняшний день модели, включающие инокуляцию бактерий, внедрённых либо в агар, полученный из морских водорослей, агарозу или в нативный альгинат, имеют ограниченный срок жизни от 1 до 3 нед. [34]. В процессе эксперимента животные либо погибают, либо становятся устойчивыми к манипуляциям [34, 35, 40, 49].

Технологический прогресс способствует более активному применению в различных областях медицины девайсов, внедряемых в организм человека. Это значительно облегчает жизнь пациентов, однако одновременно способствует росту числа имплантат-ассоциированных инфекций. Порядка 60–70% всех внутрибольничных инфекций связаны с использованием медицинских имплантатов различного профиля, что делает разработку соответствующих моделей чрезвычайно актуальной. Перспективно внедрение в макроорганизм предварительно колонизированных имплантатов. Одним из их преимуществ является контроль инокулята на имплантате до вставки [47, 50].

Особенности *in vivo* бактерий в биоплёнках, имитирующих хронические инфекции, включают длительное воздействие факторов неспецифической и специфической резистентности хозяина. Бактерии должны не только противостоять бактерицидной активности иммунного ответа, но и адаптировать свой метаболизм к изменениям микросреды, возникающим в результате активности хозяина и особенностей диффузии питательных веществ в агрегационном образовании. Эти факторы влияют на рост микроорганизмов

и могут ограничить размер биоплёнки во время экспериментальной инфекции.

Исследования показали, что биоплёнки, формируемые в условиях *in vivo*, часто многочисленны и малы. Авторы отмечают, что в животных моделях чаще определяются недифференцированные биоплёночные образования, напоминающие небольшие агрегаты в водной среде [51]. Биоплёнки *in vivo* меньше по физическим размерам по сравнению с биоплёнками *in vitro*, у них нет грибовидных структур, они встроены в материал хозяина и постоянно подвергаются защитным реакциям хозяина [17]. Исключением являются модели, имитирующие катетер/шунт-опосредованные инфекции с использованием полых трубок, где наблюдается гораздо большее накопление биоплёнки [38].

На примере *S. aureus* было продемонстрировано, что бактерии используют разные стратегии для развития биоплёнок *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* биоплёнки стафилококка в основном состоят из «самопроизводящегося» внеклеточного матрикса (ЕСМ) полисахаридной природы. В условиях же *in vivo* золотистый стафилококк образует белковые биоплёнки, используя факторы хозяина, экспрессия генов, ассоциированных с ЕСМ, при этом изменяется. Различные пути развития приводят к формированию различных по составу биоплёнок, что необходимо учитывать при планировании эксперимента и оценке результатов исследований [52].

Заключение

В эпоху глобальной угрозы формирования поли- и панрезистентности микробов к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам, роста

внутрибольничных инфекций, связанных зачастую с внедрением в организм пациента имплантируемых изделий, моделирование в условиях *in vitro* и *in vivo* инфекций, вызванных микробными сообществами, безусловно, является востребованным и чрезвычайно актуальным. Перспективны оптимизация имеющихся методов *in vitro* с максимальным приближением к условиям существования в живом организме, а также разработка моделей хронической инфекции с возможностью наблюдения в течение длительного промежутка времени (в течение недель, месяцев, лет) по аналогии с хронической инфекцией человека. Учитывая, что лечение хронических инфекций — это воздействие на микробное сообщество в целом, необходимо понимание механизмов формирования, структурирования, закономерностей функционирования биоплёнки, которое в настоящее время требует реализации современных методов геномики, транскриптомики и протеомики. Необходимы новые подходы к диагностике и лечению хронических инфекций: определение новых целевых точек действия химиотерапевтических препаратов, тестирование их антимикробной активности не на отдельных штаммах микробов, а на воспроизведённой модели микробного консорциума в определённой эконше.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения НИР по теме «Разработка композиций для персонализированной антибактериальной терапии на основе вирулентных стафилококковых бактериофагов с контролируемой литической активностью».

Литература/References

1. Голиков А. А. Роберт Кох. Сердечный приступ. doi://proza.ru/2015/03/24/2325 [Golikov A. A. «Robert Koh. Serdechnyj pristup». doi://proza.ru/2015/03/24/2325 (in Russian)]
2. Costerton J. W., Geesey G. G., Cheng K.-J. How bacteria stick. *Scientific American*. 1978; 238 (1): 86–95. doi:10.1038/scientificamerican0178-86.
3. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995; 49: 711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
4. Ehrlich G. D., Hu F. Z., Shen K., Stoodley P., Post J. C. Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 437: 20–24. doi: 10.1097/00003086-200508000-00005.
5. Dowd S. E., Sun Y., Secor P. R., Rhoads D. D., Wolcott B. M., James G. A., Wolcott R. D. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol*. 2008; 8: 43. doi: 10.1186/1471-2180-8-43.
6. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000; 182 (10): 2675–2679. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
7. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
8. El-Azizi M., Mushtaq A., Drake C., Lawhorn J., Barenfanger J., Verhulst S., Khardori N. Evaluating antibiograms to monitor drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11 (8): 1301–1302. doi: 10.3201/eid1108.050135.
9. Irie Y., Borlee B. R., O'Connor J. R., Hill P. J., Harwood C. S., Wozniak D. J., Parsek M. R. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109 (50): 20632–6. doi: 10.1073/pnas.1217993109. Epub 2012 Nov 21. PMID: 23175784; PMCID: PMC3528562.
10. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*. 2013; 136: 1–51. doi: 10.1111/apm.12099. PMID: 23635385.
11. Мальцев С. В., Мансурова Г. Ш. Что такое биоплёнка? Практическая медицина. 2011; 53: 7–10 [Mal'cev S. V., Mansurova G. Sh. Chto takoe bioplenka? Prakticheskaya medicina. 2011; 53: 7–10 (in Russian)]
12. McCoy W. E., Bryers J. D., Robbins J., Costerton J. W. Observations of fouling biofilm formation. *Can J Microbiol*. 1981. Vol. 27, no. 9. P. 910–917. doi: 10.1139/m81-143. PMID: 7306879.
13. Teske A., Stahl D. A. Microbial mats and biofilms: Evolution, structure and function of fixed microbial communities, in biodiversity of microbial life: foundation of earth's biosphere. J. T. Staley (ed.). New York: Wiley-Liss. 2002; 49–100.
14. Hoiby N., Flensburg E. W., Beck B., Friis B., Jacobsen S. V., Jacobsen L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Scand J Respir Dis*. 1977; 58 (2): 65–79.
15. Lam J., Chan R., Lam K., Costerton J. W. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun*. 1980; 28 (2): 546–556. doi: 10.1128/iai.28.2.546-556.1980. PMID: 6772562; PMCID: PMC550970.

16. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
17. Bjarnsholt T., Alhede M., Alhede M., Eickhardt-Sørensen S. R., Moser C., Kihl M., Jensen P. Ø., Høiby N. The *in vivo* biofilm. *Trends Microbiol.* 2013; 21 (9): 466–474. doi: 10.1016/j.tim.2013.06.002.
18. Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jørgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol.* 2003; 48 (6): 1511–1524. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03525x. PMID: 12791135.
19. Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 2003; 4 (6): 219. doi: 10.1186/gb-2003-4-6-219. Epub 2003 May 27. PMID: 12801407; PMCID: PMC193612.
20. O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49. PMID: 11018124.
21. Schembri M. A., Kjaergaard K., Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol.* 2003; 48 (1): 253–267. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03432.x. PMID: 12657059.
22. Whiteley M., Banger M. G., Bumgarner R. E., Parsek M. R., Teitzel G. M., Lory S., Greenberg E. P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature.* 2001; 413 (6858): 860–864. doi: 10.1038/35101627. PMID: 11677611.
23. Stanley N. R., Britton R. A., Grossman A. D., Lazazzera B. A. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol.* 2003; 185 (6): 1951–1957. doi: 10.1128/JB.185.6.1951-1957.2003.
24. Wen Z. T., Burne R. A. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68 (3): 1196–1203. doi: 10.1128/AEM.68.3.1196-1203.2002.
25. Лямин А. В., Боткин Е. А., Жестков А. В. Методы выявления биоплёнок в медицине: возможности и перспективы. *КМАХ.* 2012; 14 (1): 17–22. [Lyamin A. V., Botkin E. A., Zhestkov A. V. Metody vyjavlenija bioplenok v medicine: vozmozhnosti i perspektivy. *KMAH.* 2012. 14 (1): 17–22. (in Russian)]
26. Merritt J. H., Kadouri D. E., O'Toole G. A. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol.* 2005. Chapter 1: Unit 1B.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.
27. Jakobsen T. H., van Gennip M., Christensen L. D., Bjarnsholt T., Givskov M. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro*. *Methods Mol Biol.* 2011; 692: 253–263. doi: 10.1007/978-1-60761-971-0_18.
28. Schwartz K., Stephenson R., Hernandez M., Jambang N., Boles B. R. The use of drip flow and rotating disk reactors for *Staphylococcus aureus* biofilm analysis. *J Vis Exp.* 2010; 27 (46): 2470. doi: 10.3791/2470.
29. Li B., Dunham S. J. B., Ellis J. F., Lange J. D., Smith J. R., Yang N., King T. L., Amaya K. R., Arnett C. M., Swedler J. V. A versatile strategy for characterization and imaging of drip flow microbial biofilms. *Anal Chem.* 2018; 90 (11): 6725–6734. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00560.
30. Schwartz K., Stephenson R., Hernandez M., Jambang N., Boles B. R. The use of drip flow and rotating disk reactors for *Staphylococcus aureus* biofilm analysis. *J Vis Exp.* 2010; 27 (46): 2470. doi: 10.3791/2470.
31. Марданова А. М., Кабанов Д. А., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. Биоплёнки: основные принципы организации и методы исследования. Казань: Линк. 2016; 42. [Mardanova A. M., Kabanov D. A., Rudakova N. L., Sharipova M. R. Bioplenki: osnovnye principy organizacii i metody issledovaniya. Kazan': Link. 2016; 42. (in Russian)]
32. Тец В. В., Тец Г. В. Микробные биоплёнки и проблемы антибиотикотерапии. *Практическая пульмонология.* 2013; 4: 60–64. [Tec V. V., Tec G. V. Mikrobnye bioplenki i problemy antibiotikoterapii. *Prakticheskaja Pul'monologija.* 2013; 4: 60–64. (in Russian)]
33. Ehrlich G. D., Veeh R., Wang X., Costerton J. W., Hayes J. D., Hu F. Z., Daigle B. J., Ehrlich M. D., Post J. C. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA.* 2002; 287 (13): 1710–1715. doi: 10.1001/jama.287.13.1710.
34. Pedersen S. S., Shand G. H., Hansen B. L., Hansen G. N. Induction of experimental chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection with *P. aeruginosa* entrapped in alginate microspheres. *APMIS.* 1990; 98 (3): 203–211.
35. Hoffmann N., Rasmussen T. B., Jensen P. Ø., Stub C., Hentzer M., Molin S., Ciofu O., Givskov M., Johansen H. K., Høiby N. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infect Immun.* 2005; 73 (4): 2504–2514. doi: 10.1128/IAI.73.4.2504-2514.2005.
36. Moser C., Van Gennip M., Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Lee B., Hougen H. P., Calum H., Ciofu O., Givskov M., Molin S., Høiby N. Novel experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection model mimicking long-term host-pathogen interactions in cystic fibrosis. *APMIS.* 2009; 117 (2): 95–107. doi: 10.1111/j.1600-0463.2008.00018.x.
37. Schaber J. A., Triffo W. J., Suh S. J., Oliver J. W., Hastert M. C., Griswold J. A., Auer M., Hamood A. N., Rumbaugh K. P. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect Immun.* 2007; 75 (8): 3715–3721. doi: 10.1128/IAI.00586-07.
38. van Gennip M., Christensen L. D., Alhede M., Quortrup K., Jensen P. Ø., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. Interactions between polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on silicone implants *in vivo*. *Infect Immun.* 2012; 80 (8): 2601–2607. doi: 10.1128/IAI.06215-11. Epub 2012 May 14. PMID: 22585963; PMCID: PMC3434577.
39. Christensen L. D., Moser C., Jensen P. Ø., Rasmussen T. B., Christophersen L., Kjelleberg S., Kumar N., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an *in vivo* intraperitoneal foreign-body infection model. *Microbiology (Reading).* 2007; 153 (7): 2312–2320. doi: 10.1099/mic.0.2007/006122-0. PMID: 17600075.
40. Moser C., Jensen P. Ø., Kobayashi O., Hougen H. P., Song Z., Rygaard J., Kharazmi A. H. Improved outcome of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is associated with induction of a Th1-dominated cytokine response. *Clin Exp Immunol.* 2002; 127 (2): 206–213. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01731.x.
41. Moser C., Hougen H. P., Song Z., Rygaard J., Kharazmi A., Høiby N. Early immune response in susceptible and resistant mice strains with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection determines the type of T-helper cell response. *APMIS.* 1999; 107 (12): 1093–1100. doi: 10.1111/j.1699-0463.1999.tb01514.x. PMID: 10660139.
42. Prabhakara R., Harro J. M., Leid J. G., Keegan A. D., Prior M. L., Shirliff M. E. Suppression of the inflammatory immune response prevents the development of chronic biofilm infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2011; 79 (12): 5010–5018. doi: 10.1128/IAI.05571-11.
43. Trøstrup H., Thomsen K., Christophersen L. J., Hougen H. P., Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Kirkby N., Calum H., Høiby N., Moser C. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm aggravates skin inflammatory response in BALB/c mice in a novel chronic wound model. *Wound Repair Regen.* 2013; 21 (2): 292–299. doi: 10.1111/wrr.12016.
44. Brady R. A., Leid J. G., Calhoun J. H., Costerton J. W., Shirliff M. E. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 52 (1): 13–22. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x.
45. Pedersen S. S., Shand G. H., Hansen B. L., Hansen G. N. Induction of experimental chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection with *P. aeruginosa* entrapped in alginate microspheres. *APMIS.* 1990; 98 (3): 203–211.
46. Calum H., Moser C., Jensen P. Ø., Christophersen L., Maling D. S., van Gennip M., Bjarnsholt T., Hougen H. P., Givskov M., Jacobsen G. K., Høiby N. Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156 (1): 102–110. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03861.x.
47. Li D., Gromov K., Soballe K., Puzas J. E., O'Keefe R. J., Awad H., Drissi H., Schwarz E. M. Quantitative mouse model of implant-associated osteomyelitis and the kinetics of microbial growth, osteolysis, and humoral immunity. *J Orthop Res.* 2008; 26 (1): 96–105. doi: 10.1002/jor.20452.
48. Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Jakobsen T. H., Phipps R., Nielsen A. K., Rybte M. T., Tolker-Nielsen T., Givskov M., Høiby N., Ciofu O., Scandianavian Cystic Fibrosis Study Consortium. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2010; 5 (4): 10115. doi: 10.1371/journal.pone.0010115.
49. van Heeckeren A. M., Schluchter M. D., Xue W., Davis P. B. Response to acute lung infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173 (3): 288–296. doi: 10.1164/rccm.200506-917OC.
50. Buret A., Ward K. H., Olson M. E., Costerton J. W. An *in vivo* model to study the pathobiology of infectious biofilms on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25 (7): 865–874. doi: 10.1002/jbm.820250706. PMID: 1918103.
51. Costerton J. W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. Biofilms, the customized microclimate. *J Bacteriol.* 1994; 76 (8): 2137–2142. doi: 10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994.
52. Juu-Ching Shu, Chi-Yu Hsu, Chih-Ching Wu, Mei-Hui Lin, Chien-Cheng Chen, Ching-Hsi Hsiao. The *in vivo* biofilm formation of *Staphylococcus aureus* in a mouse model: albumin is the major biofilm matrix (preprint). doi: 10.21203/rs.3.rs-3368672/v1.

Поступила / Received 01.11.2024

Принята в печать / Accepted 15.11.2024

Информация об авторах

Даудова Адиля Джигангировна — к. м. н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8607-2395

Демина Юлия Заурбековна — старший преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0428-2570.

Рубальский Олег Васильевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2904-9276

Ясенявская Анна Леонидовна — к. м. н., доцент, руководитель Научно-исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864.

About the authors

Adilya D. Daudova — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8607-2395

Yuliya Z. Demina — Senior lecturer of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0428-2570

Oleg V. Rubalsky — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2904-9276

Anna L. Yasyavskaya — Ph. D. in Medicine, Associate Professor, Head of the Research Center, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864.