

Биоплёнки микроорганизмов: современные представления

А. А. ХРЯНИН¹¹ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

Microbial Biofilms: Modern Concepts

A. A. KHRYANIN

¹ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

В обзоре обсуждаются современные представления о биоплёнках микроорганизмов. Рассматриваются фазы развития, строение и компоненты биоплёнок как возможные факторы антибиотикорезистентности (АБР). Приводятся примеры различных типов АБР у биоплёночных бактерий. Рассматривается процесс коллективной регуляции посредством координации экспрессии генов в популяции бактерий, опосредующий специфическое поведение клеток. Оценены различные подходы, оказывающие действие на компоненты биоплёнок с целью снижения уровня их резистентности/целостности с использованием сочетания антибактериальных препаратов и ферментов различного происхождения. Перспективными признаются способы воздействия на компоненты матрикса, сигнальные молекулы и факторы адгезии. Перспективным направлением повышения эффективности влияния антибиотиков на биоплёнки является применение гидролитических ферментов.

Ключевые слова: биоплёнки, матрикс, персистеры, антибиотикорезистентность, чувство кворума, ферменты.

The review discusses modern ideas concerning the biofilms of microorganisms. The development phases, structure and components of biofilms are considered as possible antibiotic resistance factors (ARF). Examples of various types of ADB in biofilm bacteria are given. The process of collective regulation through coordination of gene expression in a bacterial population that mediates the specific behavior of cells is considered. Various approaches that affect the components of biofilms have been evaluated in order to reduce their resistance/integrity using a combination of antibacterial drugs and enzymes of various origins. Promising methods for influencing matrix components, signaling molecules, and adhesion factors are recognized. A promising way to increase the effectiveness of the effect of antibiotics on biofilms is the use of hydrolytic enzymes.

Keywords: biofilms, matrix, persisters, antibiotic resistance, quorum sensing, enzymes.

Введение

Более 30 лет назад была сформулирована концепция микробных сообществ, получивших название «биоплёнки» (англ. — biofilms), которую признают одной из наиболее важных достижений последних лет для микробиологии и для медицины в целом [1]. Жизнь микробов в составе сообществ биоплёнок столь же принципиально отличается от этих давно сформировавшихся представлений, как жизнь охотника-одиночки от существования огромного мегаполиса [2, 3]. Существовавшие с момента открытия микробов Антони ван Левенгуком принципы изучения микроорганизмов базируются на представлениях, будто основной причиной инфекционного процесса и заболевания служит множество одинаковых и самостоятельных микроорганизмов.

Однако уже достоверно установлено, что и в естественных условиях, и в организме человека и животных, и в условиях производств все микробы существуют не как самостоятельные и изолирован-

ные клетки, а находятся в составе биоплёнок [4, 5]. Показано, что микробные сообщества образуют все представители нормальной микрофлоры и возбудители болезней. Формирование и распространение биоплёнок в организме играют важнейшую роль в развитии патологического процесса [6, 7].

В настоящее время доказано, что более 70% инфекционных заболеваний человека сопровождаются или опосредованы образованием биоплёнок (данные Центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC)) [8]. К ним относят как основные инфекционные болезни всех систем и органов, так и «терапевтические» инфекции (например, *Helicobacter pylori*). При том, что инфекционные заболевания остаются ведущей причиной смертей во всем мире, очевидно, что именно применение антибиотиков служит основой этиотропной терапии большинства болезней. Появление в арсенале лекарственной терапии антибиотиков позволило за последние 70 лет резко снизить смертность и значительно повысило продолжительность жизни людей. Однако рост антибиотикорезистентности (АБР) в последние годы привлёк внимание исследователей к феномену биоплёнок как одной из ведущих причин АБР [7–11].

© А. А. Хрянин, 2020

Адрес для корреспонденции:

E-mail: khryanin@mail.ru

Неуклонно растущий интерес исследователей к проблематике биоплёнок подчёркивается количеством публикаций на тему биоплёнок; например, ресурс PubMed отражает наличие более 38 тыс. публикаций на эту тему, статистика по годам приведена на рис. 1.

Биоплёнки

Явление образования биоплёнок открыто в середине 1980-х гг. [12–13]. Изначально биоплёнки микроорганизмов рассматривались как механизм, позволяющий бактериям выживать в сложных условиях. Однако дальнейшее изучение позволило понять, что биоплёнки служат естественной формой существования микробов, в то время как планктонные (свободные) формы представляют лишь одну из стадий развития микробного сообщества [6, 14–15].

В течение последующих лет исследований биоплёнок было доказано, что биоплёнокообразование присуще массе патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [16–17], а механизм образования биоплёнок расценивается как фактор патогенности [6, 7, 16].

Строение биоплёнок

Микробные биоплёнки — это сообщества, образованные родственными и неродственными бактериями, отграниченными от внешней среды, при этом клетки внутри сообществ имеют специализацию и контактируют между собой.

Ключевыми особенностями биоплёнок считаются:

- изоляция от окружающей среды оболочкой;
- образование внеклеточного матрикса;
- наличие межбактериальных контактов и взаимодействия;

- кооперация клеток, образующих биоплёнку и наличие у них дифференциации признаков.

Все представители нормальной микрофлоры в организме человека существуют в составе биоплёнок. Микробы в составе биоплёнки поддерживают свой состав и расселяются за счёт клеток, которые периодически высвобождаются и мигрируют, способствуя распространению инфекции. Биоплёнки разных микробов имеют сходный принцип строения. Основными компонентами являются собственно бактерии, межклеточный матрикс и поверхностная оболочка, отграничивающая сообщество от окружающей среды [8, 11, 18–19]. В состав поверхностной оболочки и матрикса биоплёнок входят полисахариды в количестве от 40 до 95% (в т.ч. декстран, гиалуроновая кислота, целлюлоза и др.). Концентрация прочих химических компонентов сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов — до 40% и нуклеиновых кислот (внеклеточной ДНК и РНК) — 1–20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, т.к. 80–90% объёма биоплёнки занимает вода [8, 13]. Известно, что внеклеточная ДНК и белки бактериальных биоплёнок играют важную роль в морфогенезе и функциональных изменениях биоплёнок, необходимых для их сохранения [20–21].

Матрикс, внеклеточная полимерная субстанция (extracellular polymeric substances), внутренняя среда сообществ биоплёнок, имеет огромное значение в жизни микробного сообщества: он формирует внутреннюю среду, может связывать или не пропускать, и/или инактивировать антибиотики; обеспечивает циркуляцию питательных веществ и жидкостей, транспорт токсинов, метабо-

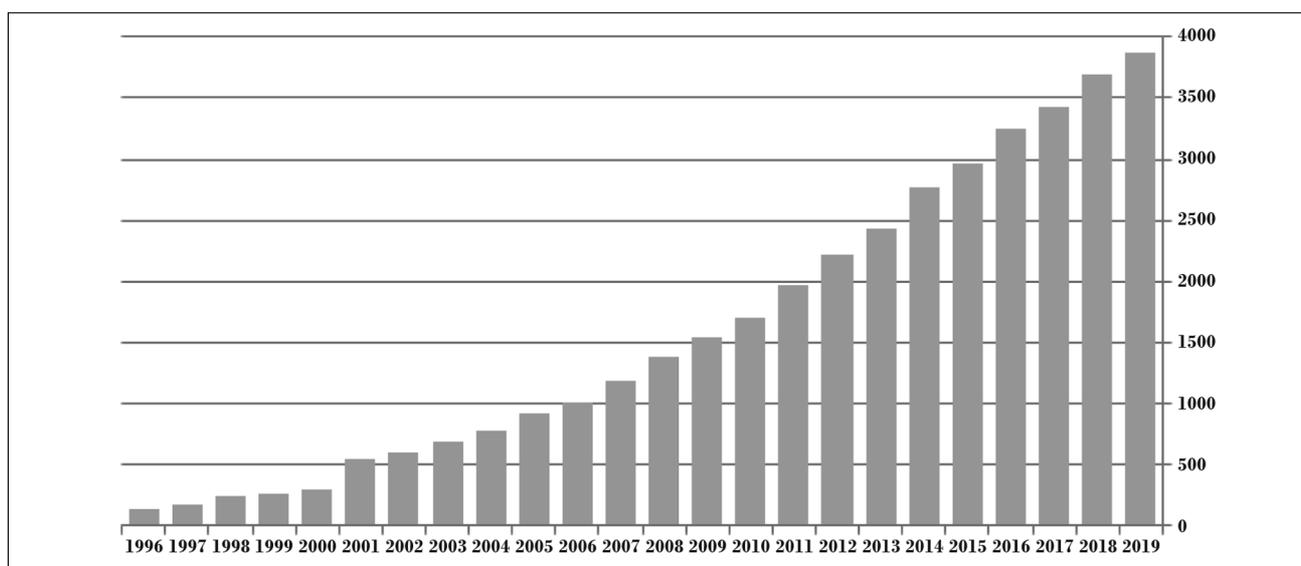


Рис. 1. Динамика числа статей по тематике биоплёнок (biofilms); (дата обращения — 17.04.2020, Pubmed.gov)

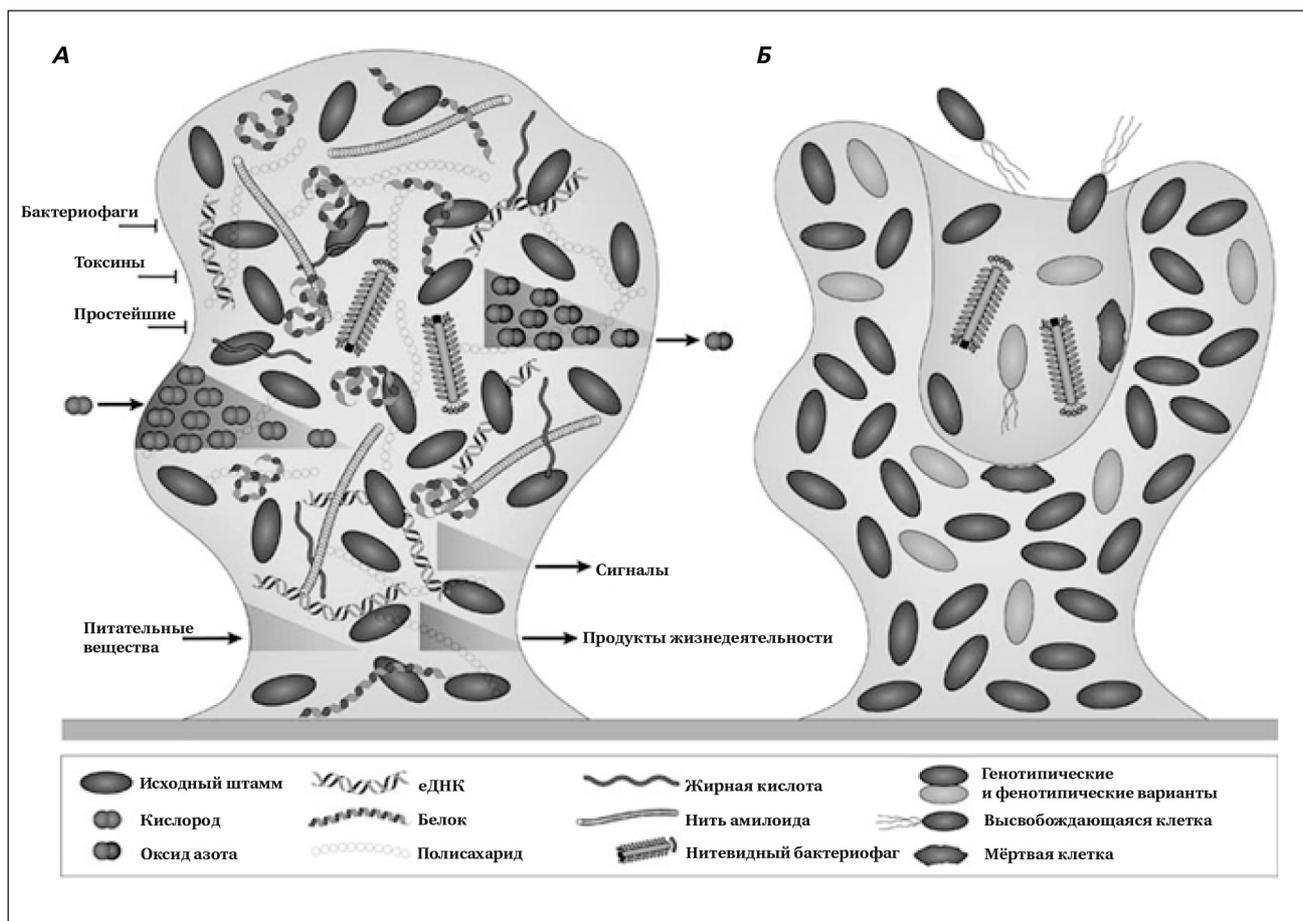


Рис. 2. Ультраструктура биоплёнок (цит. по [22]).

литов, газов, сигнальных молекул и т. п. (рис. 2) [20–23]. На рис. 2 представлено многообразие внутренней среды колоний: помимо собственно клеток с признаками дифференциации, матрикс содержит белки и полисахариды, жирные кислоты и другие продукты жизнедеятельности; фрагменты ДНК, а также массу низкомолекулярных веществ, имеющих регуляторную функцию, т. н. сигнальных молекул.

Поверхностная мембрана состоит из компонентов клеточных мембран участников сообщества и обладает схожими свойствами (рис. 3).

Бактерии внутри изолированных биоплёнок приобретают дополнительные преимущества по сравнению с изолированными клетками. Для практической медицины особенно важно, что микробы в биоплёнках характеризуются повышенной выживаемостью в присутствии антимикробных веществ, факторов иммунного надзора, антибиоти-

ков и антисептиков. Бактерии в биоплёнках выживают в присутствии антибиотиков в дозах, в 500–1000 раз выше их минимальной подавляющей концентрации [10, 16]. Столь разительное изменение устойчивости к антибиотикам у бактерий в биоплёнках является предметом интенсивного изучения. Очевидно, что в основе по-

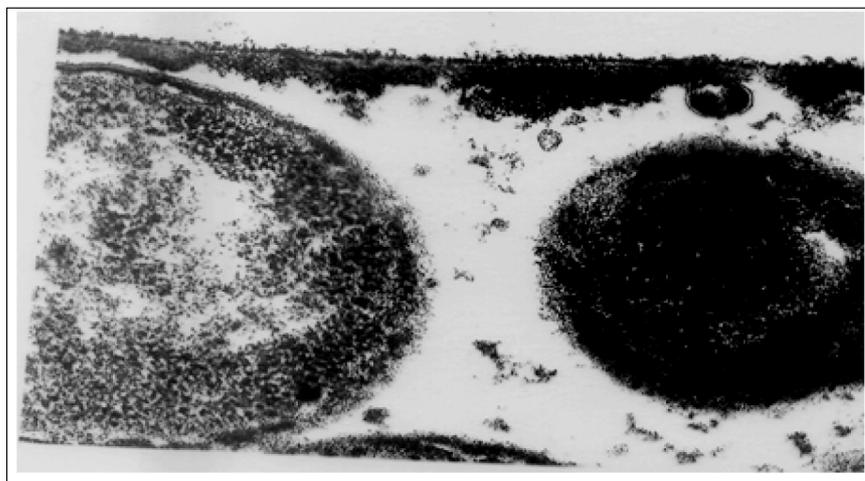


Рис. 3. Ультраструктура поверхностной мембраны биоплёнки *Escherichia coli* (ATCC 25922), (цит. по [2]).

Таблица 1. Компоненты биоплёнок как факторы АБР

| Компонент | Функции |
|-----------------------|--|
| Поверхностная плёнка | Защита от внешних воздействий Барьер для веществ, включая антибиотики Обратный транспорт (эффлюкс) Рецепторы |
| Межклеточное вещество | Создаёт среду сообщества Накопление метаболитов Накопление токсинов Транспорт сигнальных молекул Связывание веществ, проникающих в сообщество, включая антибиотики |
| Внеклеточная ДНК | Способствует перераспределению генетической информации между клетками |

Таблица 2. Примеры различных типов АБР у биоплёночных бактерий

| Вариант АБР | Бактерия, у которой обнаружен данный тип устойчивости | Биохимический механизм возникновения устойчивости | Ссылка |
|--|---|--|--------|
| Нарушение проницаемости наружной мембраны | <i>Vibrio cholerae</i> | Мутации, ведущие к структурным изменениям порина OmpU | [25] |
| Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Гиперэкспрессия MexCD-OprJ эффлюкс-помпы | [26] |
| Инактивация антибиотика | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Продукция β -лактамаз | [27] |
| Модификация мишени действия | <i>Staphylococcus aureus</i> | Мутации, изменившие ДНК-зависимую РНК-полимеразу — основную мишень рифампицина | [28] |

добной улучшенной выживаемости находятся свойства внеклеточного матрикса и поверхностной мембраны (табл. 1).

Компоненты биоплёнки как факторы АБР

Для отдельных (планктонных) микробных клеток описаны пять основных типов устойчивости к антибиотикам: инактивация антибиотика, модификация мишени, активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс), нарушение проницаемости внешней оболочки микробной клетки, формирование метаболического шунта [24].

Накопленная к настоящему времени научная информация позволяет видеть, что у микробов в биоплёнках присутствуют почти все типы известной «планктонной» резистентности (табл. 2).

Эффективность проникновения антибиотиков в значительной степени связана с их способностью преодолевать поверхностную оболочку и межклеточный матрикс биоплёнок. В составе последнего содержится значительное количество различных липидов, по качественному составу аналогичных мембранным [29, 30].

Установлено, например, что в сообщества *Klebsiella pneumoniae* плохо проникает ампициллин, а в биоплёнке *Enterococcus faecalis* — ампициллин, ко-тримаксозол и ванкомицин [31, 32]. В биоплёнке ряда микробов по тем же механизмам затруднено проникновение амоксициллина [33].

Однако в биоплёнках существуют ещё и особые, присущие только им формы устойчивости, которые могут быть связаны по крайней мере с тремя или даже более типами механизмов [34, 35].

Первым из них следует считать формирование клеток-персистеров. Персистеры — это клетки с особым фенотипическим вариантом генотипа, с сильно заторможенным метаболизмом. Подобную метаболическую инертность клеток с выключением биохимических реакций иногда называют бактериальным анабиозом [36]. Именно поэтому персистеры устойчивы практически ко всем препаратам [36–38].

По разным данным и в разных популяциях, доля персистеров сильно различается, составляя от 15 до 85%, при этом отмечается, что в неблагоприятных условиях она значимо возрастает [38–40].

Внутри как мономикробных, так и неродственных (полимикробных) сообществ резистентность может быть связана с фильтрующей способностью матрикса. Матрикс образует внутреннюю среду сообщества, пространственно и функционально связывая клетки в единую структуру, заполняет всё межклеточные пространства, образуя трёхмерную сложнейшую систему, созревающую вместе с сообществом. Всё это позволяет считать поверхностную мембрану и матрикс своеобразным «молекулярным фильтром» и выделять фильтрацию поступающих веществ в качестве одной из важнейших функций биоплёнки [20, 41, 42]. Опубликованы работы, в которых наблюдали замедленную диффузию антибиотиков внутрь биоплёнок. Например, было описано затруднение пенетрации ципрофлоксацина внутрь биоплёнки, сформированной *Pseudomonas aeruginosa* [43]. Показано, что поверхностно (по отношению к мембране биоплёнки) расположенные бактерии сильнее подвержены воздействию антибиотика, чем глубоко расположенные клетки [44]. Механизмом этих эффектов

может быть как связывание антибактериальных агентов, так и их инактивация.

Предложена 3-уровневая систематизация устойчивости бактерий к антибиотикам, учитывающая наличие биоплёнок [45]. Связанный с биоплёнками надклеточный уровень устойчивости определяют как толерантность, она опосредуется трудностями преодоления антибиотиком (-ами) поверхностной оболочки и матрикса биоплёнки, а также отсутствием действия антибиотика на часть популяции клеток (персистеры), которые находятся в неактивном состоянии [46]. Второй уровень устойчивости связан со свойствами клеточной стенки и наличием выкачивающих помп, обеспечивающих резистентность к противомикробным препаратам. Третий уровень — цитоплазматический, ассоциированный с изменением доступности мишени антибиотика и регуляцией генов. Также показано, что спорообразующие бактерии имеют ещё и 4-й уровень, связанный с устойчивостью бактериальных спор к действию антибиотиков и антисептиков/дезинфектантов [35, 47].

К интересным и важным следует отнести и обнаруженный феномен «читинга» (от *англ.* cheating — обман, мошенничество), который заключается в следующем: даже дефектные по способности синтезировать биоплёночный матрикс и формировать самостоятельные биоплёнки микроорганизмы могут участвовать в биоплёнокообразовании, используя компоненты биоплёнок, продуцируемые другими микробами [20, 48]. В данном контексте само понятие «небиоплёнокообразующие микроорганизмы» теряет свой смысл.

Ещё одной ключевой особенностью биоплёнок, как коопераций бактерий, является феномен Quorum sensing (QS), дословно — чувство кворума. QS — это процесс коллективной регуляции при помощи координации экспрессии тех или иных генов, опосредующий специфическое поведение клеток и синтез веществ. Впервые явление межклеточной коммуникации обнаружено и описано у симбиотической морской бактерии *Vibrio fischeri* [49]. Формирование, рост, дифференциация планктонных и биоплёночных фенотипов клеток в биоплёнках регулируются на уровне популяции посредством механизмов межклеточной коммуникации, формируясь при достижении некоей критической массы/количества бактерий-участников [50]. Установлено, что межклеточные взаимосвязи влияют на экспрессию генов вирулентности, регулируют рост участников сообщества, направление и характер подвижности (таксис), а также процессы апоптоза и токсинообразования [34, 35, 50].

Функция QS аналогична гормональной регуляции органов в многоклеточном организме. Разные микробы используют различные сигнальные системы и разные химические передатчики сиг-

налов: 7–8-членные пептиды и циклопептиды характерны для грамположительных, а разнообразные ацилгомосерин лактоны (AHL) — для грамотрицательных микроорганизмов [8]. QS на основе AHL обнаружен у многих грамотрицательных бактерий: *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia* и др. [51]. Именно реакции QS опосредуют «социальные» отношения в микробной популяции, образуется «коммуникационная сеть», при этом важно, что такое «общение» возможно и среди неродственных микроорганизмов.

Биоплёнка так же является идеальной нишей для обмена генетической информацией между бактериями. Антибиотикорезистентные бактерии способны не только выделять защитные ферменты или протеины, которые могут защищать соседние антибиотикочувствительные бактерии в биоплёнке [22], но и передавать другим, даже не родственным по виду, бактериям гены, ответственные за антибиотикорезистентность [29].

Подходы к терапии

Понимание того факта, что микроорганизмы в составе биоплёнок обретают новые свойства, предполагающие существенное снижение чувствительности к стандартным методам этиотропной терапии, включающей антибиотики, заставляет исследовать всё новые способы воздействия. Кратное увеличение дозировок антибактериальных средств малоэффективно, ибо достижение эффективных концентраций в условиях *in vivo* недостижимо по понятным причинам. Поэтому рассматривается масса подходов, оказывающих влияние на компоненты биоплёнок с целью снижения уровня их резистентности/целостности с использованием сочетания антибактериальных препаратов [52], антисептиков [52–54], органических кислот [54, 55], солей металлов [56], микробных метаболитов и бактериофагов [57, 58], ферментов различного происхождения [59–61], муколитиков [62, 63]. Перспективными признаются способы воздействия на компоненты матрикса, сигнальные молекулы, факторы адгезии [64].

Использование в качестве адьювантов антимицробной терапии ферментов насчитывает не одно десятилетие [10, 65–70]. Показана возможность влияния на формирующиеся биоплёнки с помощью лизоцима, альгинатлиазы, целлюлазы [71], различных протеиназ и их комбинаций [65–69], ДНК-азы [72], гиалуронидазы [73].

Сложная организация и состав матрикса биоплёнок, разнообразие сигнальных молекул как возможных объектов воздействия обосновывает применение комбинаций гидролитических энзимов с протео-, липо- и амилолитической активностью и возможностью влияния на нуклеин-со-

держателем компоненты биоплёнок. Официальные препараты (Вобэнзим, Флогэнзим), содержащие требуемые комбинации, объединяются понятием «системная энзимотерапия» и также применяются в сочетании с антибиотиками в терапии многих заболеваний [74]. Исследования действия отдельных протеолитических гидролитических энзимов и их комбинаций на формирование микробных биоплёнок показали дозозависимое угнетение процессов формирования биоплёнок для стандартных штаммов и биоплёнок бактерий, изолированных от больных (тест-штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий из различных коллекций: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 и выделенные от больных с флегмонами и абсцессами в области головы и шеи, а также от больных шигеллезами в клиниках Санкт-Петербурга — *Staphylococcus aureus* VT-38, *Staphylococcus epidermidis* VT-27 и VT-43, *Shigella flexneri* 2a-VT12406). Причём результаты были более выраженные при раннем внесении энзимов (в растущие биоплёнки) полной комбинации энзимов (Вобэнзим) [60]. Эффект антибиотиков в присутствии отдельных энзимов и их комбинаций усиливался: при использовании моноэнзимов (папаин или трипсин) число КОЕ снижалось в среднем в 3 раза, а при использовании Вобэнзима в 5 раз [60]. Немаловажно, что пациенты, от которых производился забор бактерий для данного исследования, в дальнейшем получали терапию антибиотиками и Вобэнзимом и имели достоверно лучшие результаты лечения бактериальных инфекций, чем при стандартной терапии антибиотиками без системной энзимотерапии [75, 76].

Описана способность комплекса гидролитических энзимов, входящих в состав Вобэнзима, уменьшать количество внеклеточного матрикса, что способствовало снижению эффективности

передачи генов (в т. ч., плазмид резистентности) между бактериями биоплёнок [61].

Установлено статистически значимое снижение частоты передачи плазмидных генов антибиотикоустойчивости в бактериальных биоплёнках использованных штаммов (*E.coli* HB101, tetR, имеющие хромосомный ген устойчивости к тетрациклину и *E.coli* DH5 alfa, rus 19 ampR, несущие ген устойчивости к ампициллину) [61]. Эти данные служат объяснением известной и показанной в клинических исследованиях способности препаратов системной энзимотерапии повышать эффективность антибактериальной терапии [67–69, 74–79].

Заключение

Бактериальные биоплёнки — это сообщества микроорганизмов, встроенных в матрикс внеклеточных полимерных веществ (субстанций), которые продуцируются самими бактериями биоплёнки и включают белки, полисахариды, нуклеотиды в разных соотношениях. Состав внеклеточных полимерных веществ видоспецифичен, а также варьирует в зависимости от условий формирования биоплёнки. Биоплёнка должна рассматриваться как защитная структура, которая благодаря свойствам матрикса, позволяет клеткам пережить неблагоприятные условия. Это нормальная и предпочтительная форма существования консорциума. Наличие биоплёнок является одним из главных факторов развития антибиотикорезистентности. Пути преодоления устойчивости в биоплёнке направлены, во-первых, на предотвращение адгезии, во-вторых, на предотвращение перехода к образованию биоплёнки и подавление роста (антибиотики, биоциды) и, в-третьих, на разрушение сформированной биоплёнки (медиаторы чувства кворума, ферментные препараты).

ЛИТЕРАТУРА

- Characklis W.G., Cooksey K.E. Biofilms and microbial fouling. Adv Appl Microbiol 1983; 29: 93–137. doi: 10.1016/S0065-2164(08)70355-1.
- Клеточные сообщества. Под ред. Тетса В. В. СПб.: 1998. — 220 с. / Kletochnye soobshchestva. Pod red. Tetsa V. V. SPb.: 1998; 220. [in Russian]
- Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биоплёнки — город микробов или аналог многоклеточных организмов? Микробиология. — 2007. — Т. 76. — № 2. — С. 125–138. / Nikolaev Jyu.A., Plakunov V.K. Bioplenki — gorod mikrobov ili analog mnogokletochnykh organizmov? Mikrobiologiya 2007; 76 (2): 125–138. [in Russian]
- Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гицбург А.Л. Биоплёнки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и система регуляции их развития. Генетика. — 2004. — Т. 40. — № 11. — С. 1445–1456. / Il'ina T.S., Romanova Jyu.M., Gintsburg A.L. Bioplenki kak sposob sushchestvovaniya bakterij v okruzhajushchej srede i organizme khozyaina: fenomen, geneticheskij kontrol' i sistema reguljatsii ikh razvitiya. Genetika 2004; 40 (11): 1445–1456. [in Russian]
- Тутельян А.В., Юшина Ю.К., Соколова О.В. и др. Образование биологических плёнок микроорганизмов на пищевых производствах. Вопросы питания. — 2019. — Т. 88. — № 3. — С. 32–43. Doi: 10.24411/0042-8833-2019-10027. / Tutel'yan A.V., Jyushina Jyu.K., Sokolova O.V. i dr. Obrazovanie biologicheskikh plenok mikroorganizmov na pishchevykh proizvodstvakh. Voprosy pitaniya 2019; 88 (3): 32–43. Doi: 10.24411/0042-8833-2019-10027. [in Russian]
- Stoodley P., Sauer K., Davies D. G., Costerton J. W. Biofilms as complex differentiated communities. Ann Rev Microbiol 2002; 56: 187–209. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284: 1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
- Тец В.В., Тец Г.В. Микробные биоплёнки и проблемы антибиотикотерапии. Атмосфера. Пульмонология и аллергология. — 2013. — № 4. — С. 60–64. / Tets V.V., Tets G.V. Mikrobnye bioplenki i probleme antibiotikoterapii. Atmosfera. Pul'monologiya i Allergologiya 2013; 4: 60–64. [in Russian]
- Kiechowski M.R., Horswille A. R. New approaches for treating Staphylococcal biofilm infections. Ann NY Acad Sci 2011; 1241: 104–121. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06281.x.
- Кюрринг Г.Ю., Стернин Ю.И., Минаев С.В., Новожилев А.А. Интенсификация антибактериальной терапии при гнойно-воспалительных заболеваниях. Военно-медицинский журнал. — 2008. — № 329 (10). — С. 35–41. / Knorring G.Jyu., Sternin Jyu.I., Minaev S.V., Novozhilov A.A. Intensifikatsiya antibakterial'noj terapii pri gnojnovospalitel'nykh zabolovaniyakh. Voenno-Meditsinskij Zhurnal 2008; 329 (10): 35–41. [in Russian]
- Costerton W., Veeh R., Shirtliff M. et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. Clin Invest 2003; 112: 1466–1477. doi: 10.1172/JCI20365.
- Tetz V.V., Rybalchenko O.V., Savkova G.A. Ultrastructure of surface film of bacterial colonies. J Gen Microbiol 1993; 137: 1081–1088. doi: 10.1099/00221287-139-4-855.

13. *Marshag P.A., Loeb G.I., Cowan M.M., Fletcher M.* Response of microbial adhesives and biofilm matrix polymers to chemical treatments as determined by interference reflection microscopy and light section microscopy. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 2827–831.
14. *Tetz V.V.* Colony-like communities of bacteria. *Microbios*. 1994;80(322):63–5.
15. *O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R.* Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol* 2000; 54: 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
16. *Gristina A.G.* Biofilms and chronic bacterial infections. *Clin Microbiol Newslett* 1994; 16 (22): 171–176. doi: //doi.org/10.1016/0196-4399(94)90037-X.
17. *Donlan R.M., Costerton J.W.* Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167–193. doi: 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002.
18. *Sponza D.T.* Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme Microb Technol* 2003; 32: 375–385.
19. *Sutherland I.W.* Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147: 3–9. doi: 10.1099/00221287-147-1-3.
20. *Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Маянский Н.А.* Матрикс микробных биопленок. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2016. — Т. 18. — № 1. — С. 9–19. / *Chebota' I.V., Mayanskij A.N., Mayanskij N.A.* Matriks mikrobnnykh bioplenok. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2016; 18 (1): 9–19. [in Russian]
21. *Тец Г.В., Артеменко Н.К., Вечерковская М.Ф., Тец В.В.* Роль матричных компонентов во взаимодействии бактериофагов с биопленочными бактериями. Практическая пульмонология. — 2017. — № 3. — С. 55–57. / *Tetz G.V., Artemenko N.K., Vechevkovskaya M.F., Tetz V.V.* Rol' matrichnykh komponentov vo vzaimodejstvii bakteriofagov s bioplenochnymi bakteriyami. *Prakticheskaya pul'monologiya* 2017; 3: 55–57. [in Russian]
22. *McDougald D., Rice S., Barraud N. et al.* Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 39–50. doi: https://doi.org/10.1038/nrmicro2695.
23. *Tetz V.V., Rybalchenko O.V., Savkova G.A.* Ultrastructural features of microbial colony organization. *J Basic Microbiol* 1990; 30 (8): 597–607. doi: 10.1002/jobm.3620300819.
24. *Стрaчуnский Л.С., Козлов С.Н.* Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей. М.: Боргес, 2002. — 432 с. / *Strachunskij L.S., Kozlov S.N.* Sovremennaya antimikrobnaya khimioterapiya. *Rukovodstvo dlya vrachej*. М.: Borges, 2002; 432. [in Russian]
25. *Pagel M., Simonet V., Li J., Lallemand M. et al.* Phenotypic characterization of pore mutants of the *Vibrio cholerae* porin OmpU. *J Bacteriol* 2007; 189: 8593–8600. doi: 10.1128/JB.01163-07.
26. *Mandsberg L.F., Ciofu O., Kirkby N. et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2483–2491. doi: 10.1128/AAC.00428-08.
27. *Ciofu O.* *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal betalactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. *APMIS Suppl* 2003; 116: 41–47.
28. *Yu J., Wu J., Francis K.P. et al.* Monitoring *in vivo* fitness of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* mutants in a mouse biofilm infection model. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 528–534. doi: 10.1093/jac/dki053.
29. *Tetz V.V., Korobov V.P., Artemenko N.K. et al.* Extracellular phospholipids of isolated bacterial communities Biofilms 2004; 1: 149–155. doi: 10.1017/S147905050400136X.
30. *Chambless J.D., Hunt S.M., Philip S.S.* A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials *Appl Environmental Microbiol* 2006; 72: 2005–2013. doi: 10.1128/AEM.72.3.2005-2013.2006.
31. *Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S.* Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1818–1824.
32. *Sandoe J.A.T., Wysome J., West A.P. et al.* Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 767–770.
33. *Yang Y., Sreenivasan P.K., Subramanyam R., Cummins D.* Multiparameter assessments to determine the effects of sugars and antimicrobials on a polymicrobial oral biofilm. *Appl Environmental Microbiol* 2006; 72: 6734–6742. doi: 10.1128/AEM.01013-06.
34. *Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д. и др.* Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2012. — Т. 4. — № 1. С. 51–58. / *Chebota' I.V., Mayanskij A.N., Konchakova E.D. i dr.* Antibiotikorezistentnost' bioplenochnykh bakterij. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2012; 4 (1): 51–58. [in Russian]
35. *Тец В.В., Вечерковская М.Ф., Тец Г.В.* Споробиота: свойства и роль в патологии человека. Лечебное дело. — 2018. — № 4. — С. 90–96. doi: 10.24411/2071-5315-2018-12072. / *Tetz V.V., Vechevkovskaya M.F., Tetz G.V.* Sporobiota: svoystva i rol' v patologii cheloveka. *Lechebnoe delo* 2018; 4: 90–96. doi: 10.24411/2071-5315-2018-12072. [in Russian]
36. *Lewis K.* Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 357–372. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134306.
37. *Льюис К.* Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок. Биохимия. — 2005. — № 70 (2). — С. 327–336. / *Ljyuys K.* Persistirujushchie kletki i zagadka vyzhivaniya bioplenok. *Biokhimiya* 2005; 70 (2): 327–336. [in Russian]
38. *Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В.* Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках. *Микробиология*. — 2010. — № 79 (4). — С. 447–458. / *Plakunov V.K., Strelkova E.A., Zhurina M.V.* Persistentsiya i adaptivnyj mutagenез v bioplenkakh. *Mikrobiologiya* 2010; 79 (4): 447–458. [in Russian]
39. *Harrison J.J., Ceri H., Roper N.J. et al.* Persister Cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology* 2005; 151: 3181–3195. doi: 10.1099/mic.0.27794-0.
40. *Shah K.D., Spoering A.N., Lewis K.K.* Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; 186: 8172–8180. doi: 10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004.
41. *Романова Ю.М., Гицбург А.Л.* Бактериальная биопленка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2011. — № 3. — С. 99–109. / *Romanova Jy.M., Gintsburg A.L.* Bakterial'naya bioplenka kak estestvennaya forma sushchestvovaniya bakterij v okruzhajushchej srede i organizme khozjaina. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii* 2011; 3: 99–109. [in Russian]
42. *Dunne W.M. Jr.* Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 155–166. doi: 10.1128/cmr.15.2.155-166.2002.
43. *Suci P.A., Mittelman M.W., Yu F.P., Geesey G.G.* Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2125–2133. doi: 10.1128/aac.38.9.2125.
44. *Amorena B., Gracia E., Monzon M. et al.* Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 43–55. doi: 10.1093/jac/44.1.43.
45. *Zhou G., Shi Q.S., Huang X.M., Xie X.B.* The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *Int J Mol Sci* 2015; 16 (9): 21711–21733. doi: 10.3390/ijms160921711.
46. *Balcázar J.L., Subirats J., Borrego C.M.* The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 2015; 6: 1216. doi: 10.3389/fmicb.2015.01216.
47. *Tetz G.V., Tetz V.V.* Introducing the sporobiota and sporobiome. *Gut Pathogens* 2017; 9: 38. doi: 10.1186/s13099-017-0187-8.
48. *Boyle K.E., Heilmann S., van Ditmarsch D., Xavier J.B.* Exploiting social evolution in biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16 (2): 207–212. doi: 10.1016/j.mib.2013.01.003.
49. *Williams P.* Quorum sensing, communication and crosskingdom signalling in the bacterial world *Microbiology* 2007; 153: 3923–3938. doi: 10.1099/mic.0.2007/012856-0.
50. *Mehta P. et al.* Information processing and signal integration in bacterial quorum sensing. *Mol. Syst Biol* 2009; 5: 325. doi: 10.1038/msb.2009.79.
51. *McDougald D. et al.* Signal-mediated cross-talk regulates stress adaptation in *Vibrio* species. *Microbiology* 2003; 149 (7): 1923–1933. doi: 10.1099/mic.0.26321-0.
52. *Davies D.* Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 114–122. doi: 10.1038/nrd1008.
53. *Чекулаев М. В.* Воздействие различных химических и биологических факторов на биопленки условно-патогенных микроорганизмов. Наука-2020. — 2019. — № 8 (33). — С. 79–88. / *Chekulaev M. V.* Vozdejstvie razlichnykh khimicheskikh i biologicheskikh faktorov na bioplenki uslovno-patogennykh mikroorganizmov. *Nauka-2020* 2019; 8 (33): 79–88. [in Russian]
54. *Коломојцева Т.Н.* Опыт применения препарата Гексикон в терапии смешанных бактериально-грибковых инфекций влагалища. Новые технологии в охране репродуктивного здоровья: Материалы региональной научно-практической конференции. Пермь, 2003. — С. 60–61. / *Kolomojtseva T.N.* Opyt primeneniya preparata Geksikon v terapii smeshannykh bakterial'no-gribkovykh infektsij vlagalishcha. *Novye tekhnologii v okhrane reproduktivnogo zdorov'ja: Materialy regional'noj nauchno-prakticheskoy konferentsii*. Perm', 2003; 60–61. [in Russian]
55. *Кира Е.Ф., Прилепская В.Н., Костава М.Н. и др.* Современные подходы к выбору препарата локального действия в терапии бактериального вагиноза. Акушерство и гинекология. — 2012. — № 7. — С. 59–67. / *Kira E.F., Prilepskaya V.N., Kostava M.N. i dr.* Sovremennye podkhody k vyboru preparata lokal'nogo dejstviya v terapii bakterial'nogo vaginoza. *Akusherstvo i ginekologiya* 2012; 7: 59–67. [in Russian]
56. *Milani M., Arcellona E., Agnello A.* Efficacy of the combination of oral tinidazole and acidic buffering vaginal gel in comparison with vaginal clindamycin alone in bacterial vaginosis: a randomized, investigator-blinded, controlled trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 109 (1): 67–71.

57. *Campanac C., Pineau L., Payard A. et al.* Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1469–1474. doi: 10.1128/aac.46.5.1469-1474.2002.
58. *Польгач О.А., Дабижеева А.Н., Ворошилова Н.Н.* Влияние композиции литических бактериофагов *P.aeruginosa* на формирование и разрушение бактериальных биопленок. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2018. — Т. 17. — № 4. — С. 20–25. / *Polygach O.A., Dabizheva A.N., Voroshilova N.N.* Vliyanie kompozitsii liticheskikh bakteriofagov *P.aeruginosa* na formirovanie i razrushenie bakterial'nykh bioplenok. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika* 2018; 17 (4): 20–25. [in Russian]
59. *Марков А.А., Тимохина Т.Х., Паромова Я.И.* Экспериментальное обоснование применения экзотомоболитов *Bifidobacterium bifidum* для предотвращения биопленкообразования на поверхности титановых имплантатов с пористым покрытием. Медицинская наука и образование Урала. — 2018. — Т. 19. — № 1. — С. 153–156. / *Markov A.A., Timokhina T.Kh., Paromova Ya.I.* Eksperimental'noe obosnovanie primeneniya ekzotomobolitov bifidobacterium bifidum dlya predotvrashcheniya bioplenkoobrazovaniya na poverkhnosti titanovykh implantatov s poristym pokrytiem. *Meditsinskaya nauka i obrazovaniye Urala*. — 2018; 19 (1): 153–156. [in Russian]
60. *Тец В.В., Кнорринг Г.Ю., Артеменко Н.К. et al.* Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии. Антибиотики и химиотер. — 2004. — Т. 49. — № 12. — С. 9–13. / *Tets V.V., Knorring G.Jyu., Artemenko N.K. et al.* Vliyanie ekzogenykh proteoliticheskikh fermentov na bakterii. *Antibiotiki i khimioter* 2004; 49 (12): 9–13. [in Russian]
61. *Тец Г.В., Артеменко Н.К., Заславская Н.В. и др.* Влияние экзогенных протеолитических ферментов на передачу плазмидных генов в смешанных бактериальных биопленках. Антибиотики и химиотер. — 2009. — Т. 54. — № 9–10. — С. 3–5. / *Tets G.V., Artemenko N.K., Zaslavskaya N.V. i dr.* Vliyanie ekzogenykh proteoliticheskikh fermentov na peredachu plazmidnykh genov v smeshannykh bakterial'nykh bioplenkakh. *Antibiotiki i khimioter* 2009; 54 (9–10): 3–5. [in Russian]
62. *Macchi A., Ardito F., Marchese A. et al.* Efficacy of N-acetylcysteine in combination with thiamphenicol in sequential (intramuscular/aerosol) therapy of upper respiratory tract infections even if sustained by bacterial biofilms. *J Chemotherapy* 2006; 18: 507–513.
63. *Roveta A., Debbia E., Schito G., Marchese A.* Comparison of the activity of N-acetylcysteine, ambroxol, bromexine and sobrerol on *Staphylococcus aureus* biofilms. *GIMMOC* 2004; 8: 1–12.
64. *Mark D., Becker P., Chatterjee I. et al.* Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol* 2004; 294: 203–212. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.015.
65. *Luerti M., Vignali M.* Influence of bromelain on penetration of antibiotics in uterus, salpinx and ovary. *Drugs Expl Clin Res* 1978; 4 (1): 45–48.
66. *Barsom S., Sasse-Rollenhagen K., Betrmann A.* Erfolgreiche Prostatitisbehandlung mit hydrolytischen Enzymen. *Erfahrungsheilkunde* 1982; 31: 2.
67. *Ремезов А.П., Кнорринг Г.Ю.* Системная энзимотерапия в комплексной терапии инфекционных болезней. Лечащий врач. — 2003. — № 9. — С. 74–75. / *Remezov A.P., Knorring G.Jyu.* Sistemnaya enzimoterapiya v kompleksnoy terapii infektsionnykh boleznej. *Lechashchij vrach* 2003; 9: 74–75. [in Russian]
68. *Ремезов А.П., Кнорринг Г.Ю.* Системная энзимотерапия в лечении инфекций, передаваемых половым путем. Клиническая дерматология и венерология. — 2005. — № 1. — С. 83. / *Remezov A.P., Knorring G.Jyu.* Sistemnaya enzimoterapiya v lechenii infektsij, peregdaemykh polovym putem. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya* 2005; 1: 83. [in Russian]
69. *Хрянин А.А.* Эффективность комплексного применения доксициклина моногидрата и флогензима в лечении больных с хронической урогенитальной хламидийной инфекцией. Вестник дерматологии и венерологии. — 2004. — № 5. — С. 37–41. / *Khryanin A.A.* Effektivnost' kompleksnogo primeneniya doksitsiklina monogidrata i flogenzima v lechenii bolnykh s khronicheskoy urogenital'noy khlamidiyной infektsiej. *Vestnik dermatologii i venerologii* 2004; 5: 37–41. [in Russian]
70. *Гостищев В.К.* Энзимотерапия неспецифической хирургической инфекции. Автореф... докт. мед. наук. М.: 1972. / *Gostishchev V.K.* Enzimoterapiya nespecificheskoj khirurgicheskoy infektsii. *Avtoref... dokt. med. nauk. M.: 1972.*
71. *Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2018; 17 (6): 1484–1502. doi: 10.1111/1541-4337.12382
72. *Тец Г.В., Артеменко К.Л.* Совместное действие антибиотиков и дезоксирибонуклеазы на бактерии. Антибиотики и химиотер. — 2006. — Т. 51. — № 6. — С. 3–6. / *Tets G.V., Artemenko K.L.* Sovmestnoe dejstvie antibiotikov i dezoksiribonukleazy na bakterii. *Antibiotiki i khimioter* 2006; 51 (6): 3–6. [in Russian]
73. *Тризна Е.Ю., Байдамшина Д.Р., Витницкий А.А., Каюмов А.Р.* Влияние *in vitro* изолированного и сочетанного с антибактериальными средствами применения бовгиалуронидазы азоксимера на целостность бактериальной биопленки и жизнеспособность микроорганизмов. Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2020. — № 83 (2). — С. 38–44. / *Trizna E.Jyu., Bajdamshina D.R., Vinitckij A.A., Kajumov A.R.* Vliyanie *in vitro* izolirovannogo i sochetannogo s antibakterial'nymi sredstvami primeneniya bov-gialuronidazy azoksimer na tselostnost' bakterial'noj bioplenki i zhiznesposobnost' mikroorganizmov. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* 2020; 83 (2): 38–44. [in Russian]
74. *Михайлов И.Б., Стернин Ю.И.* Избранные вопросы клинической фармакологии системной энзимотерапии. Архив внутренней медицины. — 2012. — № 1 (3). — С. 15–19. / *Mikhajlov I.B., Sternin Jyu.I.* Izbrannye voprosy klinicheskoy farmakologii sistemnoj enzimoterapii. *Arkhiv# vnutrennej meditsiny* 2012; 1 (3): 15–19. [in Russian]
75. *Артеменко К.Л., Кнорринг Г.Ю.* Опыт применения ферментного комплекса вобэнзим у больных с абсцессами и флегмонами челюстно-лицевой области. Ученые записки С.-Петербурга. гос. мед. ун-та им. Павлова. — 2005. — Т. 12. — № 3. — С. 43–47. / *Artemenko K.L., Knorring G.Jyu.* Opyt primeneniya fermentnogo kompleksa vobenzim u bolnykh s abstessami i flegmonami cheljustno-litsevoj oblasti. *Uchenye Zapiski S.-Peterb. Gos. Med. Un-ta im. Pavlova* 2005; 12: 3: 43–47. [in Russian]
76. *Хрянин А.А., Решетников О.В., Сафронов И.Д.* Роль экзогенных протеолитических ферментов в иммуногенезе при урогенитальных инфекциях. Антибиотики и химиотер. — 2012. — Т. 57. — № 9–10. — С. 25–31. / *Khryanin A.A., Reshetnikov O.V., Safronov I.D.* Rol' ekzogenykh proteoliticheskikh fermentov v immunogeneze pri urogenital'nykh infektsiyakh. *Antibiotiki i Khimioter* 2012; 57: 9–10: 25–31. [in Russian]
77. *Кнорринг Г.Ю., Стернин Ю.И., Минаев С.В., Новожилов А.А.* Интенсификация антибактериальной терапии при гнойно-воспалительных заболеваниях. Военно-медицинский журнал. — 2008. — Т. 329. — № 10. — С. 35–41. / *Knorring G.Jyu., Sternin Jyu.I., Minaev S.V., Novozhilov A.A.* Intensifikatsiya antibakterial'noj terapii pri gnojnovospalitel'nykh zabolevaniyakh. *Voенno-Meditsinskij Zhurnal* 2008; 329: 10: 35–41. [in Russian]
78. *Клячкина И.Л., Рыбаченко В.В., Кнорринг Г.Ю., Воронина Е.В.* Опыт и перспективы системной энзимотерапии при лечении заболеваний дыхательных путей. Доктор.Ру. — 2006. — № 2 (27). — С. 7–10. / *Klyachkina I.L., Rybachenko V.V., Knorring G.Jyu., Voronina E.V.* Opyt i perspektivy sistemnoj enzimoterapii pri lechenii zabolevanij dykhatel'nykh putej. *Doktor.Ru* 2006; 2 (27): 7–10. [in Russian]
79. *Системная энзимотерапия: Сборник под ред. М.А.Репиной, Г.Ю.Кнорринга.* СПб.: Человек. 2002. — 112 с. / *Sistemnaya enzimoterapiya: Sbornik pod red. M.A.Repinoj, G.Jyu.Knorringa.* SPb.: Chelovek. 2002; 112. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хрянин Алексей Алексеевич — д. м. н., профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России; вице-президент РОО «Ассоциация акушеров-гинекологов и дерматовенерологов», Новосибирск. ORCID: 0000-0001-9248-8303