

4. Красочко, П.А. Иммунологическая оценка бактериальных полисахаридов, полученных из бактерий / П.А.Красочко, В.А. Машеро // "Инфекция и иммунитет". Материалы Республ. научно-практ. конф., посв. 75-летию БелНИИЭВ. 9-10 декабря 1999 г. Минск, БИТ "Хата", 1999. - С.505-507

5. Красочко, П.А. Влияние бактериального липополисахарида на клеточный иммунитет и продуктивность телят / П.А.Красочко // Использование физических и биологических факторов в ветеринарии и животноводстве. Матер. Всес.научн.конф. 11-12 сентября 1991 г. Москва 1992.- С.53-54.

6. Красочко, П.А. Стимуляция иммунной системы телят бактериальным липополисахаридом для профилактики респираторных инфекций / П.А.Красочко// Профилактика и меры борьбы с болезнями молодняка сельскохозяйственных животных. Тез. докл. научн.-произв. конф. Витебск, 12-13 сентября 1990 г.Минск, 1990.- С.112-113.

7. Методические рекомендации по использованию бактериальных липополисахаридов для стимуляции иммунной системы животных / П.А.Красочко[и др.]– УП «Арти-Фекс», Минск, 2013. – 40 С.

8. Шляхов Э.Н., Кику В.Ф. Стимуляция поствакцинального иммунитета /Э.Н.Шляхов, В.Ф.Кику— Кишинев: Штиинца, 1984.— 200 с.

## **БИОПЛЕНКОВАЯ АНТИБИОТИКОВАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ И БИОПЛЕНКОИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ**

**КРАСОЧКО П.А., КОРОЧКИН Р.Б., ГВОЗДЕВ С.Н.**

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Большинство бактерий существуют в состоянии биопленок, представляющих собой трехмерные бактериальные консорциумы, заключенные во внеклеточную полимерную субстанцию и прикрепленные субстрату. Внутри биопленок бактерии значительно менее чувствительны к защитному воздействию со стороны хозяина, что затрудняет диагностику и лечение инфекций. Многие хронические инфекции связаны с формированием в организме инфицированного животного бактериальных биопленок. Кроме того, в таком состоянии микроорганизмы на несколько порядков более устойчивы к действию антибактериальных препаратов.

**Ключевые слова:** биопленки, биопленковая антибиотиковая толерантность, ингибция, наночастицы.

## **BIOFILM ANTIBIOTIC TOLERANCE AND THE INHIBITING EFFECT OF NANOPARTICLES**

**KRASOCHKO P.A., KOROCHKIN R.B., GVOZDEV S.N.**

Vitebsk state academy of veterinary medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

Most bacteria live in biofilms, three-dimensional bacterial consortia, enclosed in an extracellular polymeric substance and attached to a substrate. Within biofilms, bacteria are significantly less sensitive to host defense, making it difficult to diagnose and treat infections. Many chronic infections are associated with the formation of bacterial biofilms in the body of an infected animal. In addition, in this state, microorganisms are several orders of magnitude more resistant to the action of antibacterial drugs.

**Keywords:** biofilms, microorganisms, biofilm antibiotic tolerance, inhibition, nanoparticles.

**Введение.** Изучение микробных биопленок имеет первостепенное значение в широком спектре отраслей, в том числе связанных с производством продуктов питания и кормов, гигиеной, медициной и фармацевтикой. Образование биопленок является важным механизмом вирулентности в патогенезе многих важных бактериальных патогенов, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и многих других [3]. Число патологий, приписываемых биопленкообразованию, велико. Некоторые примеры таковых включают вагинит, колит, конъюнктивит, гингивит, уретрит и отит. Фактически, около 80% всех микробных инфекций у людей и животных являются прямым результатом формирования бактериальных биопленок в патологическом очаге. Одной из особенных характеристик бактерий в биопленковом состоянии является повышенная их устойчивость к действию антимикробных препаратов.

**Целью исследований** явилось изучение механизмов устойчивости бактериальных биопленок к антибиотикам и оценка биопленкоингибирующего действия наночастиц различных веществ.

**Материалы и методы исследований** включали обзорные научные материалы по теме биопленкообразования. Исследования по оценке ингибирования биопленкообразования наночастицами металлов и биоэлементов проводили по методике Toole G.A & Kolter R. [4].

**Результаты исследований.** В настоящее время бактериальное биопленкообразование считается одним из основных факторов патогенности микроорганизмов. Биопленки формируются после прикрепления бактерий к твердым субстратам (поверхностям), что приводит к конгломерации бактериальных клеток. Бактериальные биопленки существенно повышают устойчивость патобионта к лекарственной терапии [1], дезинфицирующим веществам и помогают избежать воздействия иммунных реакций со стороны организма, что может способствовать хронизации инфекции [2].

Биопленки можно описать как консорциум микроорганизмов при их переходе из планктонной в статическую стадию, что способствует прикреплению и колонизации на поверхности субстрата, погруженного в водную среду. Биопленки представляют собой высокоструктурированные бактериальные сообщества, а составляющие их клетки способны взаимодействовать между собой с помощью биохимических сигналов. Они защищены внеклеточной полимерной субстанцией (ВПС), вырабатываемой самими микроорганизмами. Микроорганизмы в таком виде заключены в экзополисахаридный матрикс, а сами биопленки образуются на любой твердой поверхности при наличии влаги, а также внутри организма-хозяина. Экзополлимерный матрикс содержит значительное количество биополимеров, которые поддерживают структурную целостность самой биопленки и обеспечивают среду для размножения бактериальных клеток.

На рост биопленок оказывает влияние ряд факторов, таких как наличие питательных веществ, температура, материал субстрата, а также гидродинамика среды, при этом структурная целостность биопленки определяется условиями роста. Микробные биопленки способны положительно реагировать на внешние условия и изменять свою структуру и адгезионные свойства. Биопленки, выращенные при высоких концентрациях питательных веществ и гидростатическом давлении, более объемны, филаментированы, плотно упакованы и содержат больший матрикс внеклеточной полимерной субстанции.

Самой главной отличительной особенностью микроорганизмов в состоянии биопленок является феномен биопленковой антибиотиковой толерантности (БАТ). Хотя механизмы устойчивости планктонных бактерий к антибиотикам, как правило, хорошо изучены (мутации, механизм эффлюксного насоса и синтез ферментов, модифицирующих действие антибиотика), они не отвечают за биопленковую устойчивость к антибиотикам. Штаммы бактерий, изначально чувствительные к лекарственным препаратам, часто проявляют значительную толерантность к антибиотикам при существовании в условиях биопленки, хотя при последующем диспергировании, чувствительность бактерии к противомикробным препаратам быстро восстанавливается. Таким образом, считается, что БАТ включает альтернативные механизмы бактериальной антибиотиковой резистентности.

БАТ можно разделить на две категории: природную (присущую самой природе биопленки) и индуцированную (возникающую в результате внешнего воздействия). Было идентифицировано несколько основных факторов, которые непосредственно влияют на природную толерантность. Внеклеточная полимерная субстанция биопленки долгое время считалась основным фактором антибиотиковой толерантности, так как она предотвращает проникновение антибиотика. Тем не менее, ограниченная пенетрация антибактериального вещества не всегда объясняет антибиотиковую толерантность, поэтому замедление скорости бактериального роста играет гораздо более очевидную роль в БАТ. Известно, что сложная внутренняя структура биопленки создает известным сигналом замедления роста бактерий и повышения устойчивости к противомикробным препаратам. Одним из последствий сниженного метаболизма является устойчивость к антибиотикам, то есть микроорганизмом приобретает антибиотикоустойчивый фенотип. Кроме того, эти метаболически неактивные бактерии значительно труднее культивировать, что затрудняет диагностику.

Другим важным механизмом природой БАТ является образование клеток-персистеров. Последние представляют собой мельчайшую субпопуляцию бактериальных клеток, которые существуют в общей бактериальной популяции в спящем состоянии и поэтому не проявляют чувствительность к противомикробным препаратам. Как только антибактериальное воздействие прекращается и концентрация антибиотика снижается, оставшиеся персистирующие клетки выступают в роли точки роста новой микробной популяции, что в конечном итоге приводит к восстановлению бактериальной популяции, поэтому присутствие клеток-персистеров в сообществе биопленок обеспечивает защиту от полной элиминации. Несмотря на небольшое количество, их вклад в патогенез становится более значительным при биопленковых инфекциях. Универсальное присутствие клеток-персистеров в биопленках считается

наиболее правдоподобным врожденным механизмом БАТ. Хотя клетки-персистеры не несут напрямую гены устойчивости к противомикробным препаратам, они обеспечивают идеальную платформу для развития устойчивых клонов.

Другие механизмы БАТ включают связывание и инактивацию антимикробного препарата со стороны внеклеточной полимерной субстанции, как это происходит с некоторыми антибиотиками (тобрамицин). Кроме того, уровень БАТ повышается по мере старения биопленки. Диффузия питательных веществ и кислорода ограничена в более глубоких слоях биопленки, что влияет на фенотипическую экспрессию бактерий, в результате чего бактериальная популяция растет очень медленно или вообще не увеличивается.

Механизмы индуцированной БАТ кажутся более сложными, чем врожденные факторы, но менее изучены. Антимикробная обработка представляет собой сигнал стресса для клеток, поэтому неэффективная и неполная противомикробная обработка способствует устойчивых к противомикробным препаратам клонов микроорганизма, что будет способствовать феномену БАТ.

Сравнение антибактериального действия антимикробных препаратов показывает, что для ингибции бактерий в состоянии биопленок требуется на 1–2 порядка (не менее чем в 100–250 раз) большее количество антибиотика по сравнению с планктонным состоянием.

По причине вышесказанного подавление биопленкообразования рассматривается в качестве основной мишени для фармакологического воздействия. Учитывая феномен антибиотиковой устойчивости, ингибирующее воздействие наночастиц различных веществ на способность микроорганизмов продуцировать биопленки может представлять особый интерес.

Наши исследования показали высокую биопленкоингибирующую активность наночастиц различных металлов (серебро, медь) и неметаллов (окисленный графен, кремния диоксид), причем она имеет очевидный линейный дозозависимый эффект. Наивысшие концентрации наночастиц ( $100 \text{ мкг мл}^{-1}$ ) в одинаковой степени нарушают способность разноименных бактерий к формированию биопленок (на 80,6–82,4%). При концентрации наночастиц в  $25\text{--}50 \text{ мкг}^{-1}$  сохраняется приблизительно одинаковая ингибирующая активность в отношении всех тестовых культур (50,4–53,8%), за исключением *Pseudomonas aeruginosa*, у которой биопленкообразование демонстрирует выраженную устойчивость к воздействию наночастиц (процент ингибирования — 28,2%).

Из тестированных препаратов наночастицы металлов оказывают наибольший биопленкоингибирующий эффект, хотя наночастицы неметаллов также его сохраняют, но в высоких концентрациях (выше  $75 \text{ мкг}^{-1}$ ).

#### **Заключение.**

1. Биопленковая антибиотиковая толерантность представляет многофакторный феномен, отвечающий за низкую активность антимикробного воздействия, что сопровождается низкой эффективностью лечения и хронизацией инфекционного процесса.

2. Коллоидные растворы наночастиц демонстрируют выраженный дозозависимый эффект на биопленкообразование с наибольшим процентом ингибции в более высоких концентрациях наночастиц. Наночастицы металлов (серебра, меди) более чем в 2,5 раза более активны по сравнению с наночастицами неметаллов (окисленного графена, кремния диоксида).

3. Наноразмерные частицы металлов обладают способностью ингибировать продукцию бактериальных биопленок во внешней среде в концентрациях более 10 мкг/мл.

4. Среди тестовых штаммов бактерий наибольшую чувствительность к биопленкоингибирующему воздействию наночастиц имеют энтеробактерии, чуть меньшую – золотистый стафилококк, а синегнойная палочка демонстрирует максимальную устойчивость к антибиопленковому эффекту наноразмерных частиц.

#### **Литература.**

1. Adonizio, A. Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida Plant Extracts / A. Adonizio, K. F. Kong, K. Mathee // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – Vol. 52. – P. 198–203.

2. Jefferson, K. K., Bacterial-bacterial cell interactions in biofilms: detection of polysaccharide intercellular adhesins by blotting and confocal microscopy / K. K. Jefferson, N. Cerca // *Methods in Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 341. – P. 119–126.

3. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* / K. Kalishwaralal [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – Vol. 79. – P. 340–344.

4. Toole, G. A. Initiation of biofilm formation in *pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis / G. A. Toole, R. Kolter // *Molecular Microbiology*. – 1998. – Vol. 28. – P. 449–461.