

Оценка способности сывороток крови лиц с гнойно-воспалительными заболеваниями подавлять нативную биопленку *S. aureus*

Лептеева Т. Н., Сенькович С. А., Жолудева А. А., Окулич В. К.

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Реферат. Предложен метод с использованием трифенилтетразолия хлорида для определения способности сывороток крови подавлять бактерии нативной биопленки *S. aureus*. Выполнена оценка способности сывороток крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями и здоровых лиц подавлять нативную бактериальную биопленку. Установлено, что подавляющее большинство сывороток обладает способностью подавлять бактерии биопленки *S. aureus*. Наибольшая активность наблюдалась при воздействии сывороток крови лиц с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями. Статистически значимых отличий подавления бактерий биопленки сыворотками здоровых лиц и пациентов с хроническими гнойно-воспалительными процессами не выявлено.

Ключевые слова: микробная биопленка, гнойно-воспалительные заболевания, сыворотка крови, трифенилтетразолий хлорид.

Введение. Несмотря на внедрение современных методов диагностики, лечения и профилактики, в том числе новых иммунологических и антибактериальных препаратов, до настоящего времени не



наблюдается снижения количества гнойно-воспалительных заболеваний [1]. Отмечается рост числа случаев выделения высокорезистентных изолятов бактерий. На сегодняшний день на инфекционные осложнения приходится до 40–70 % летальных случаев в хирургических стационарах [2]. К факторам, способствующим развитию гнойно-воспалительных заболеваний, необходимо отнести снижение общей иммунологической реактивности организма у лиц с тяжелой патологией и вторичными иммунодефицитными состояниями, связанными с необходимостью проведения большого числа инвазивных диагностических, а также лечебных процедур, усиление вирулентности условно-патогенной микрофлоры, патоморфизм видового и количественного состава раневой микрофлоры [3]. Среди механизмов развития антибактериальной устойчивости не последнюю роль играет способность ряда микроорганизмов к образованию биопленки.

На данный момент большинством исследователей в области микробиологии признано, что абсолютное множество микроорганизмов в естественных и искусственно созданных экосистемах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ — биопленок [4]. Показано, что микробные биопленки ответственны за этиологию и патогенез многих острых и особенно хронических бактериальных инфекций у человека. Около 80 % бактериальных инфекций человека сопровождаются образованием биопленки.

Важной причиной осложненного течения инфекций, ассоциированных с биопленкой, является повышенная устойчивость бактерий к иммунным эффекторам. Нарушение регуляции процесса воспаления неизбежно приводит к существенному изменению его течения и снижает защитный потенциал макроорганизма. В то же время воспалительную реакцию и иммунную систему все чаще рассматривают как неразрывное единство. Сегодня очень актуально мнение о том, что бактерии в составе биопленок являются недоступными для различных звеньев иммунитета. Некоторые авторы утверждают, что биопленки могут блокировать альтерацию и экссудацию как стадии воспаления, что ведет к «ступору и бездействию врожденного иммунитета» [5].

Влияние эффекторов иммунной системы на бактериальные биопленки на сегодняшний день изучено недостаточно. Есть представление о некоторых реакциях иммунных эффекторов с компонентами биопленок *in vivo*. Хотя взаимодействие некоторых факторов иммунной системы (тучные клетки, белки острой фазы воспаления, др.) и биопленок практически не изучено, имеется представление о роли определенных эффекторов гуморального и клеточного иммунитета в антибиопленочном иммунитете [5].

Гуморальный иммунный ответ призван защищать макроорганизм от внеклеточных патогенов и представлен иммуноглобулинами, системой комплемента, лизоцимом, дефензинами и др. На сегодняшний день научные исследования, связанные с изучением влияния гуморального иммунного ответа макроорганизма на микробную биопленку, фрагментарны и немногочисленны, количество этих работ значительно меньше в сравнении с изучением влияния клеточного иммунного ответа.

Для разработки новых методов терапии гнойно-воспалительных заболеваний необходимо понимание механизмов воздействия системы иммунитета на биопленку.

Ранее нами показано наличие у сывороток крови способности разрушать экзополимерный матрикс биопленок. Было выявлено, что у пациентов с тяжелыми гнойно-воспалительными процессами эта способность была достоверно ниже, чем у лиц без гнойных процессов. Возможно, это является предрасполагающим фактором тяжелого течения инфекционного процесса [6]. Представляется важным оценить способность сывороток лиц с гнойно-воспалительными процессами подавлять жизнеспособную, не измененную биопленку.

Цель работы — оценка способности сывороток крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями и здоровых лиц разрушать нативную микробную биопленку *S. aureus*.

Материалы и методы. Кровь забиралась у пациентов натошак с 8 до 9 часов утра из локтевой вены, центрифугировалась со скоростью 2000 об/мин в течение 10 мин; сыворотка отбиралась, замораживалась и хранилась при -25°C . Нами были исследованы 22 сыворотки крови лиц с гнойно-воспалительными процессами, находившимися на лечении в УЗ «Витебская клиническая больница скорой медицинской помощи», 10 сывороток крови лиц с тяжелыми бактериальными пневмониями в сравнении с 16 сыворотками здоровых лиц без гнойно-воспалительных заболеваний. Пациенты с гнойно-воспалительными процессами были разделены на две группы: 1) с хроническими гнойно-воспалительными процессами (трофические язвы нижних конечностей, хронический остеомиелит); 2) лица с острыми гнойно-воспалительными процессами (флегмоны и абсцессы мягких тканей различной локализации). Все пациенты обследованы стандартными инструментальными и клинико-лабораторными методами.

При определении способности сывороток крови разрушать биопленку использовали музейный штамм *S. aureus* (АТСС 6538), обладающий умеренной способностью к биопленкообразованию. Музейный штамм переносили на агар и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. В асептических условиях с помощью бактериологической петли готовили взвесь на бульоне Мюллера – Хинтона с оптической плотностью 0,5 единиц оптической плотности McFarland на денситометре, что соответствует конечной концентрации $1,5346 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. В лунки полистиролового планшета вносили по 150 мкл полученной взвеси бактерий. Отрицательным контролем служили лунки с 150 мкл бульона Мюллера – Хинтона без бактерий. Герметично закрытый планшет инкубировали в термостате при 37 °С в течение 48 ч.

С помощью автоматической мойки добавляли в лунки по 100 мкл дистиллированной воды. Лунки четырехкратно промывали с помощью автоматической мойки, используя 150 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл. После инкубации в контрольные лунки планшета добавляли по 0,15 мл 0,05%-го раствора ТТХ (трифенилтетразолий хлорид), разведенного на бульоне Мюллера – Хинтона. Восстановление ТТХ происходит только в живых бактериях с активными метаболическими процессами, что приводит к изменению цвета биопленки, интенсивность которого обратно пропорциональна количеству активных живых бактерий. В опытные лунки вносили по 0,15 мл 10%-й сыворотки крови, разведенные на 0,05%-го раствора ТТХ с бульоном Мюллера – Хинтона. Инкубировали планшет при температуре 37 °С в течение 3 ч. Далее лунки дважды отмывали по 0,2 мл дистиллированной водой для удаления среды. Для растворения биопленки в лунки добавляли по 0,2 мл раствора диметилсульфоксида и инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

Далее измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 492 нм. Степень подавления бактерий в биопленке определяли по формуле

$$П = (E_k - E_{оп})/E_k,$$

где E_k — оптическая плотность в контрольных лунках; $E_{оп}$ — оптическая плотность в опытных лунках.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica (Version 10, StatSoft Inc., США, лицензия № STA Ф999К347156W). Поскольку тип распределения данных отличался от нормального, для описания количественных признаков вычисляли медиану, нижний 25-й и верхний 75-й процентиля. Для сравнения достоверности отличия данных в несвязанных группах использовали критерий Манна – Уитни.

Результаты и их обсуждение. В результате исследования было установлено, что сыворотки крови абсолютного большинства исследованных лиц (45 из 48) обладали способностью подавлять активность бактерий в нативной биопленке. Наивысшей эта способность оказалась у сывороток пациентов с острыми гнойно-воспалительными процессами (медиана — 0,56; 25–75 процентиля — 0,45 и 0,74, $n = 14$) и достоверно отличалась от активности в группе лиц без гнойных процессов. В группах пациентов с тяжелыми пневмониями и хроническими гнойно-воспалительными процессами активность сывороток крови в отношении биопленки занимала промежуточное положение и не отличалась достоверно ($p > 0,05$) от других групп (таблица 1). Возможно, при увеличении количества исследованных сывороток отличия станут статистически значимыми.

Таблица 1 — Способность сывороток крови подавлять нативную бактериальную биопленку *S. aureus*

Группа	n	Медиана (25–75 процентиля)	Достоверность отличий
1. Хронические гнойно-воспалительные процессы	8	0,47 (0,29–0,56)	$p_{2-4} < 0,005$
2. Острые гнойно-воспалительные процессы	14	0,56 (0,45–0,74)	
3. Тяжелые пневмонии	10	0,43 (0,31–0,59)	
4. Лица без гнойно-воспалительных процессов	16	0,36 (0,28–0,45)	

Полученные данные позволяют предположить, что острый инфекционный процесс приводит к существенному росту факторов системы иммунитета, подавляющих активность бактерий в составе биопленки. При хронических гнойно-воспалительных процессах этого не происходит, что, воз-

можно, связано с недостаточно интенсивной стимуляцией системы иммунитета. Не исключена и обратная ситуация: недостаточно выраженная антибиопленочная активность системы иммунитета способствовала хронизации инфекционного процесса. Это предположение подтверждается нашими предыдущими исследованиями [6], где было показано, что способность сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленки при тяжелых и хронических гнойно-воспалительных процессах была достоверно ниже, чем у здоровых лиц и пациентов с легкими формами инфекционного процесса.

Заключение. На основании результатов проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Предложенный метод позволяет оценить способность сыворотки крови подавлять сформированную нативную микробную биопленку.
2. Показано, что сыворотки крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями и здоровых лиц без гнойно-воспалительных процессов подавляют активность бактерий нативной биопленки *S. aureus*.
3. Наибольшая активность подавления бактерий нативной биопленки обнаружена у сывороток крови лиц с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями.

Литература

1. Французов, В. Н. Хирургические инфекции — проблема современной медицины / Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. — 2006. — Т. 1, № 1. — С. 51–54.
2. Aslam, S. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections / S. Aslam, R. O. Darouiche // Int. J. Artif. Organs. — 2010 Sep. — Vol. 34, № 9. — P. 752–758.
3. Глушанова, Н. А. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека / А. И. Блинов, Н. Б. Алексеева // Медицина в Кузбассе. — 2015. — Спецвыпуск 2. — С. 30–35.
4. Davey, M. E. Microbial Biofilms / M. E. Davey, G. A. O’Toole // Ecology to Molecular Genetics Microbiology and Molecular Biology Reviews. — 2000. — Vol. 64(4). — P. 847–867.
5. Современные представления о механизмах взаимодействия биопленки и факторов клеточного иммунитета / Н. М. Шлепотина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2020. — № 1. — С. 83–90.
6. Оценка способности сывороток крови, иммуноглобулинов G пациентов с гнойно-воспалительными процессами и ряда ферментов к разрушению экзополимерного матрикса биопленок / В. К. Окулич [и др.] // Хирургия. Восточная Европа. — 2014. — № 3. — С. 9–17.

Estimation of the ability of serum received from patients with pyoinflammatory diseases to suppress the native *S. aureus* biofilm growth

Lepteeva T. N., Senkovich S. A., Zholudzeva A. A., Okulich V. K.

Vitebsk State Order of Peoples’ Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

The research proposes usage of triphenyltetrazolium chloride for determination of the blood serum ability to suppress native *S. aureus* biofilm bacteria growth. The ability of serum, received from patients with pyoinflammatory diseases and healthy individuals, to suppress the native bacterial biofilm growth was evaluated. The ability of the majority of blood serum species to inhibit *S. aureus* biofilm bacteria growth has been established. The greatest activity was observed in individuals with acute pyoinflammatory diseases who were influenced by blood serum. No statistically significant differences was found between the biofilm bacteria growth suppression by healthy individuals’ serum and serum received from patients who have chronic pyoinflammatory processes.

Keywords: microbial biofilm, pyoinflammatory diseases, blood serum, triphenyltetrazolium chloride.

Поступила 12.07.2021

