

*В. В. Алексейкова*

**АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ РАЗРУШАТЬ ЭКЗОПОЛИМЕРНЫЙ МАТРИКС БИОПЛЕНКИ *Staphylococcus aureus***

*Научные руководители: канд. мед. наук, доц. В. В. Приступа,*

*канд. мед. наук, доц. С. А. Сенькович*

*Кафедра офтальмологии*

*Кафедра клинической микробиологии*

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,*

*г. Витебск*

*V. V. Aleksiaikova*

**ANALYSIS OF ABILITY OF THE TEAR TO DESTROY THE EXOPOLYMERIC MA-TRIX OF BIOFILM *Staphylococcus aureus***

*Tutors: professor V. V. Pristupa, professor S. A. Senkovich*

*Department of Ophtalmology*

*Department of Clinical microbiology*

*Vitebsk State Order of Friendship Medical University, Vitebsk*

**Резюме.** Поскольку этиологическая роль биопленок в инфекционных процессах в организме человека, в том числе и в глазных инфекциях, к настоящему времени признана, вызывает интерес роль факторов местного иммунитета глаза в подобных инфекционных процессах. Цель исследования: проанализировать способность слезной жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus*. Результаты показали, что слезная жидкость имеет значительную способность разрушать матрикс биопленки *S. aureus*.

**Ключевые слова:** слеза, иммунитет, биопленка, инфекции.

**Resume.** Since the etiological role of biofilms in infectious processes in the human body, including eye infections, is now recognized, the role of local eye immunity factors in such infectious processes is of interest. Objective: to analyze the ability of the tear to destroy the exopolymer matrix of the biofilm *S. aureus*. The results showed that the lacrimal fluid has a significant ability to destroy the matrix of the biofilm *S. aureus*.

**Keywords.** tear, immunity, biofilm, infection.

**Актуальность.** Согласно современным представлениям, биоплёнка – это сообщество микроорганизмов, прикрепленных к биотической или абиотической поверхности, окружённых полимерным матриксом и обладающих сложной системой регуляции физиологических процессов, основанной на межклеточной коммуникации [1]. Микроорганизмы в составе биоплёнок приобретают качественно новые свойства по сравнению с микроорганизмами в планктонной форме: метаболическая кооперация, повышенная устойчивость к факторам системы иммунитета и высокая резистентность к антибактериальным препаратам [2].

Биопленки играют важную роль в острых и хронических инфекционных процессах в организме человека. В частности, в офтальмологической практике, интерес представляют инфекции, ассоциированные с применением интраокулярных и контактных линз, швов на роговице, приборов для интубации слезного канала [3,4]. Использование таких устройств имеет важное значение в коррекции различных пато-

ло-гий органа зрения. На ряду с этим они представляют собой поверхность, на которой может образовываться микробная биопленка. В результате чего глазные инфекции могут приобретать серьезный характер течения и резистентность к антибактериальной терапии.

Местный иммунитет глаза представлен слезной пленкой и содержащимися в ней субстанциями. Комплексные исследования по составу слезной жидкости показали, что она состоит из пептидов, метаболитов, электролитов, углеводов [5,6]. Также слезная железа выделяет большое количество разнообразных антимикробных и иммунологических факторов, благодаря которым слезная жидкость приобретает бактериостатические и бактериолитические свойства. К этим факторам относятся лактоферрин (ЛФ), лизоцим, толл-лайн рецепторы (TLR), секреторный иммуноглобулин А (sIgA), белки комплемента, гликопротеины муцина, сурфактант белка-А и D (SP-A и SP-D) и дефенсин, антимикробные пептиды [7,8].

**Цель.** Проанализировать способность слезной жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus*.

**Задачи:**

1. Оценить способность слезной жидкости разрушать матрикс биопленки *S. aureus*.

2. Сравнить активность слезной жидкости и антисептиков в отношении матрикса биопленки *S. aureus*.

**Материалы и методы:** Исследовали слезную жидкость 5 лиц без офтальмологической патологии. Забор слезной жидкости производили из конъюнктивального мешка в асептических условиях в количестве 0,5 мл. Определение способности слезной жидкости к разрушению экзополимерного матрикса биопленки производили посредством разработанного нами метода. Для этого выращивали в лабораторных условиях на инертной полимерной мембране биопленку *S. aureus* в чашке Петри со средой Мюллера-Хинтона при 37°C в течение 3 суток. Далее биопленку смывали с мембраны 0,9% раствором NaCl. К полученной суспензии добавляли 0,5% раствор конго-красного в избытке. Суспензию дважды отмывали 0,9% NaCl, для удаления не связавшегося конго красного, с последующим осаждением матрикса центрифугированием при 1000 оборотов в минуту (200 g) в течение 75 минут после каждой отмывки. Суспензию замораживали и хранили при -25°C до использования. Для приготовления рабочей суспензии матрикса биопленки разводили размороженную суспензию матрикса раствором 0,9% NaCl до оптической плотности 2,5 единицы экстинкции на многоканальном спектрофотометре Ф300 ТП при длине волны 492 нм и 0,15 мл суспензии матрикса в лунке 96-луночного плоскодонного планшета для ИФА. Далее 0,1 М раствором фосфатного буфера с рН 7,4 доводили оптическую плотность суспензии до 2 Еоп. В 1 мл рабочей суспензии содержалось 12,2 мг сухого матрикса и 0,1 мг Конго красного. В качестве консерванта в суспензию добавляли азид натрия до концентрации 2 мг/мл.

Реакцию ставили в пробирках типа эппендорф, пробы дублировались. Реакционная смесь состояла из 0,3 мл суспензии матрикса и 0,1 мл слезной жидкости. После инкубации в течение суток при 37 С° пробы центрифугировали при 10 000

обо-ротов 10 минут (7930g) на центрифуге MIKRO 120 (Hettich) для осаждения неразрушенных компонентов матрикса и переносили по 0,15 мл надосадка в лунки полистиролового плоскодонного планшета. Оценку результатов реакции производили по увеличению оптической плотности надосадка на многоканальном спектрофотометре при длине волны 492 нм в сравнении с отрицательными контрольными пробами.

Для сравнения достоверности различия опытных и контрольных проб использовали критерий Манна-Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** Нами были получены следующие значения: в опытных пробах – в пределах от 0,321 – до 0,347 единиц экстинции, в контрольных от 0,081 до 0,085 единиц экстинции (таблица 1). Таким образом, оптическая плотность надосадка во всех опытных пробах значительно превышала оптическую плотность в контрольных пробах, причем это отличие было статистически значимо ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о способности слезной жидкости разрушать экзополимерный матрикс бактериальной биопленки.

**Табл. 1** – Значения, полученные при спектрофотометрическом измерении надосадка в опытных и контрольных пробах

№ пробы	Активность (ед. экстинции)	
1	0,325	0,326
2	0,336	0,338
3	0,345	0,340
4	0,335	0,339
5	0,342	0,349
Контрольная	0,081	0,085

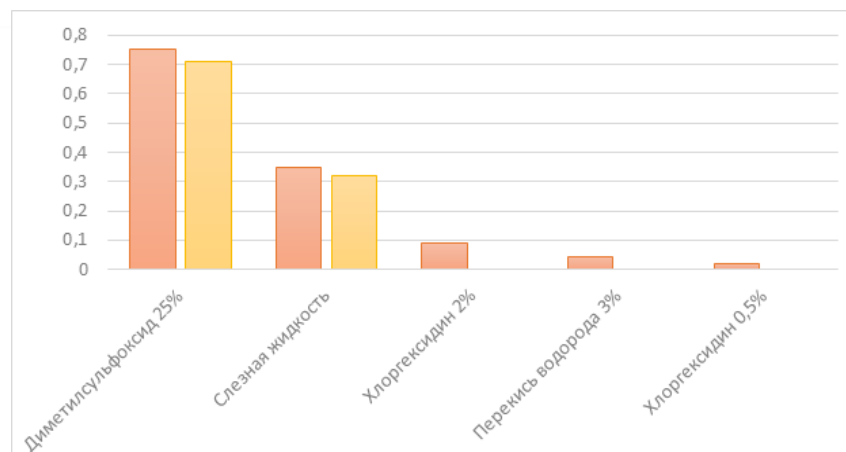
Поскольку ранее нами также было изучено действие антисептиков на матрикс биопленок при помощи данного метода[9], мы проводили сравнение между активностью слезной жидкости и активностью таких антисептиков как диметилсульфоксид 25%, растворы хлоргексидина 0,5% и 2%, перекись водорода 3% (таблица 2).

**Табл. 2** – Сравнение значений оптической плотности надосадка слезной жидкости и антисептиков

Исследуемое вещество	Активность (ед. экстинции) (Еоптическая плотность пробы – Еоптическая плотность контроля)
Слезная жидкость	0,32-0,35
Диметилсульфоксид 25%	0,71-0,75
Хлоргексидин 2%	0-0,089
Хлоргексидин 0,5%	0-0,018
Перекись водорода 3%	0-0,045

Среди антисептиков более высокой способностью к разрушению экзополимерного матрикса, по сравнению со слезной жидкостью, обладал 25% диметилсульфоксид. 2%. 0,5% растворы хлоргексидина и 3% раствор перекиси водорода обладают значительно более низкой активностью в отношении экзополимерного матрикса

био пленки *S. aureus* (Диагр.1).



Диагр. 1 – Сравнение активности слезной жидкости и антисептиков

## Выводы

1. Установлено, что слезная жидкость обладает способностью разрушать экзо-полимерный матрикс био пленки *Staphylococcus aureus*, что имеет значение в обеспечении местного антибактериального иммунитета глаза.

2. Показатели активности слезной жидкости в отношении матрикса био пленки превышают показатели активности распространенных в медицинской практике анти-септиков.

3. Метод определения способности слезной жидкости расщеплять экзо-поли-мерный матрикс био пленки может быть использован для изучения изменений актив-ности слезной жидкости при персистирующих бактериальных инфекциях органа зре-ния.

## Литература

- 1.Чеботарь И.В. Механизмы антибиоплёночного иммунитета / И. В. Чеботарь // Вестник РАМН. – 2012. – № 12. - С. 22 – 29.
- 2.Pintucci J.P. Biofilms and infections of the upper respiratory tract. / J. P. Pintucci, S. G. Corno // EurRevMedPharmacolSci. – 2010 - №14 – p. 683-90.
- 3.Costerton J. W. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. /J. W. Costerton // Int. J. Artif. Organs. – 2005 - №28 – p. 1062–1068.
- 4.Donlan R.M. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. / R. M. Donlan, , J.W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002 - №15 – p.167–193.
- 5.Butovich I.A. On the lipid composition of human meibum and tears: comparative analysis of nonpolar lipids. / I. A. Butovich // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2008 - №49 – p. 3779-3789.
- 6.Filik J, Stone N. Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy./ J. Filik // AnalyticaChimicaActa. - 2008 - №616 – p.177-184.
- 7.Lemp M. A. Advances in understanding and managing dry eye disease. / M. A. Lemp // Am J Ophthalmol. - 2008 - №146 – p.350-356.
- 8.Exposure of human corneal epithelial cells to contact lenses in vitro suppresses the up-regulation of human b-defensin-2 in response to antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. / Maltseva I.A, Fleiszig S.M.J, Evans D.J, Kerr S., Sidhu S.S., McNamara N.A., Basbaum C.// Exp Eye Res – 2007 - №85 – p. 142-153.
9. Определение чувствительности матрикса микробной био пленки к ферментам и анти-сеп-тикам / Н. Э. Колчанова, Б. Б. Н. Фершиши, В. К. Окулич, С. А. Сенькович, В. В. Алексей-кова.

Репозиторий БГМУ