

Бактериальная река: гигантская оранжевая биопленка, образованная бактериями и водорослями вокруг горячего Большого призматического источника в Йеллоустонском национальном парке

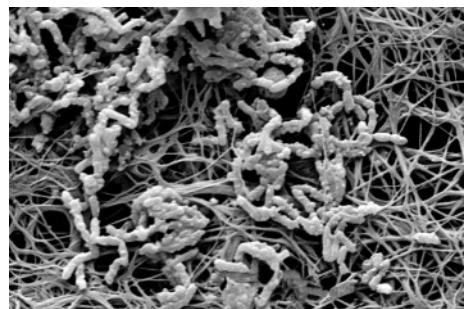


БИОХИМИЯ

Биопленки — трехмерные структуры, образуемые бактериями на поверхности субстратов, — устойчивы к антибиотикам и ежегодно уносят столько же человеческих жизней, сколько и рак. Сегодня ученые пытаются бороться с биопленками их же собственным оружием

Карин Зауэр

СКОЛЬЗКАЯ СИТУАЦИЯ



Микроугроза: внутренняя поверхность медицинского катетера покрыта бактериальной пленкой (микрофотография), способной вызвать заражение крови

ОБ АВТОРЕ

Карин Зауэр (Karin Sauer) — профессор биологии в Бингемтонском университете штата Нью-Йорк и заместитель директора Бингемтонского исследовательского центра биопленок, где она изучает механизмы образования и дисперсии биопленок, а также устойчивость человеческого организма к микробам.



Я люблю Йеллоустонский национальный парк.

Я побывала в далекой Японии, ходила по древним римским дорогам, созерцала падающую Пизанскую башню, вблизи и издали рассматривала вулканы и трогала руками ледники. И тем не менее я вновь и вновь возвращаюсь в Йеллоустон, чтобы полюбоваться его водопадами, озерами и особенно феерической расцветкой его горячих источников, гейзеров, грязевых котлов и фумарол — трещин в вулканических кратерах, откуда вырываются облака водяного пара и газов.

Меня завораживают их цвета, порождаемые плотными скоплениями миллиардов бактериальных клеток, погруженных в слизистую субстанцию — внеклеточный матрикс. Хотя отдельные бактерии неразличимы, их слизистые конгломераты — так называемые биопленки — хорошо видны и невооруженным глазом. А под микроскопом они предстают перед взором в виде удивительных трехмерных структур из прикрепленных друг к другу микробов, образующих многоуровневые переплетения тонких нитей, тяжей и крошечные, похожие на башенки фигурки. Лично мне эти структуры напоминают причудливые слизистые города — пульсирующие жизнью мегаполисы с кварталами

невысоких зданий, небоскребами и улицами, более оживленными, чем главные магистрали Токио или Нью-Йорка. На самом деле биопленки — наши хорошие знакомые: именно они образуют жирную склизкую грязь на внутренней поверхности водопроводных труб и трудноудаляемые кольца вокруг раковинных стоков.

Для медиков, однако, биопленки — не просто досадное неудобство: они представляют серьезную угрозу для нашего здоровья. Если бактериям удастся сформировать биопленку внутри нашего тела, она может стать непроницаемой для антибиотиков и превратиться в источник хронической инфекции в области хирургической раны, легких или мочевых путей. Биопленки могут колонизировать медицинские приборы, инструменты и импланты — катетеры, протезы суставов, сердечных клапанов и т.д. В общей сложности бактерии, растущие в виде биопленок, ответственны более чем за 65% всех внутрибольничных инфекций. Они приносят огромный вред: только в США ежегодно отмечается примерно 1,7 млн случаев таких инфекций и регистрируется 99 тыс. связанных с ними смертей. По мнению специалистов, каждый год биопленки уносят столько же человеческих жизней, сколько рак: поистине жуткая статистика!

Главная проблема заключается в том, что современные стратегии борьбы с бактериальными инфекциями ориентированы на уничтожение отдельных микробов, а не биопленок. Биопленки же не только обладают невероятной способностью

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

- Биопленка образуется, когда группа бактерий окружает себя слизистой субстанцией (матриком), защищающей их от антибиотиков и токсинов.
- Биологи расшифровали некоторые химические сигналы, которыми микробы обмениваются между собой перед распадом (разрушением) биопленки.
- Распад биопленки делает бактерий уязвимыми к противомикробным препаратам и может комбинироваться с другими методами борьбы с инфекциями.
- Предотвращать формирование биопленок позволяют современные наноматериалы, препятствующие прикреплению бактерий к поверхностям.

Образование и распад биопленки

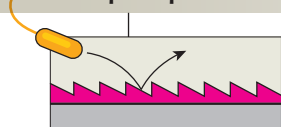
Большинство бактерий живут не поодиночке, а обширными группами — сложными, устойчивыми к воздействию внешних факторов сообществами, получившими название биопленок. Окружив себя толстым защитным слоем матрикса, микробы общаются между собой и делятся друг с другом питательными веществами. Ученые мало-помалу раскрывают тайны образования биопленок и уже научились ограничивать их рост и даже вызывать распад сформировавшихся микробных сообществ.

Жизнь биопленки

Одиночные бактериальные клетки образуют скопления. Они начинают меняться и вырабатывать иные белки, нежели одиночные микробы. Некоторые из этих белков помогают им прикрепляться к поверхности **1**. Клетки обволакивают себя слизистым матриксом, защищающим их от токсинов или антибиотиков **2**. В толще матрикса бактерии образуют микроколонию и обмениваются полезными генами и питательными веществами **3**. Когда в колонии становится слишком тесно, ее члены посылают друг другу химические сигналы о необходимости дисперсии; отщепившиеся клетки формируют новые биопленки в других местах **4**.



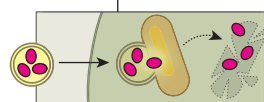
Четыре стратегии борьбы с биопленками



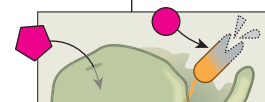
A Новые покрытия затрудняют закрепление биопленок на поверхностях. Эти материалы делают поверхность более шероховатой благодаря присутствию наноструктур, выводящих из строя белки, которые микробы используют для прикрепления к субстрату.



B Повреждение матрикса может вызвать структурный распад биопленки. Слизь содержит молекулы ДНК, которые расщепляет фермент ДНКаза I. Сегодня проверяется эффективность этого фермента для разрушения биопленок, вызывающих ушные инфекции.



C В матрикс проникают липосомы — микроскопические пузырьки с противомикробными соединениями. Сливаясь с бактериями, они высвобождают в них свое токсичное содержимое. Кроме того, в матрикс можно вводить и вирусы, заражающие или убивающие бактерии.



D О необходимости дисперсии бактерии биопленки оповещают друг друга с помощью молекул особой жирной кислоты. С помощью этой кислоты ученые провоцируют распад колонии, а одиночные микробы более уязвимы к лекарствам. В качестве сигнала к дисперсии можно использовать и газ оксид азота.

ускользнуть от воздействия защитных факторов нашего организма и, следовательно, игнорировать любые вакцины, но и иногда перестают реагировать на антибиотики. Однако эта фантастическая устойчивость к антибиотикам отнюдь не связана с приобретением бактериями резистентности к этим лекарствам или их превращением в «супермикробов», о чем так много говорят в наши дни. Сверхвыносливость придает биопленкам матрикс. Окруженные этой субстанцией, бактерии активно общаются между собой и постоянно обмениваются сигналами, позволяющими им изменять свои «архитектурные» характеристики и защищать друг друга за счет выработки необходимых для выживания белков и других веществ.

Сегодня мои коллеги и я умеем проникать внутрь матрикса и подслушивать сигналы, которыми обмениваются между собой микробы. Иногда мы можем даже контролировать подобные сигналы и использовать их против самих бактерий. Наши действия напоминают атаку на городскую информационную систему хакеров, которые, например, решили зажечь на новом месте красный запрещающий сигнал светофора и перенаправить движенье транспорта. В нашем случае мы пытаемся заставить биопленки расстаться со своим защитным матриксом, что вернет микробам уязвимость к лекарственным препаратам. В своих исследованиях мы исходили из сложившегося ранее представления, что бактерии в биопленках принципиально

отличаются от одиночных микробов. В 1998 г. Джордж О’Тул (George O’Toole) и Роберто Колтер (Roberto Kolter) показали, что для образования биопленки почвенным бактериям *Pseudomonas fluorescens* требуются синтез новых белков и присутствие 24 генов. Функции большинства этих генов были неизвестны, но некоторые из них кодировали адгезины и другие белки, используемые бактериями для связывания с поверхностью. А в 2002 г. мои сотрудники и я обнаружили, что, образовав контакт с поверхностью, бактерии изменяются и продолжают трансформироваться по мере превращения биопленки из скопления нескольких прикрепившихся к субстрату клеток в многочисленную колонию микробов: на каждой стадии ее развития они вырабатывают различные наборы белков. Из дальнейших исследований стало ясно, что эти белки делают возможным переход от одной стадии развития биопленки к другой.

Данные факты свидетельствуют о том, что биопленки, подобно городам, растут в вертикальном направлении в соответствии с неким поэтапным генеральным планом развития. В лаборатории, добавляя химические вещества, подавляющие или стимулирующие выработку определенных белков, мы можем останавливать образование биопленок на определенных стадиях развития и даже обращать этот процесс вспять, заставляя их возвращаться к предшествующим стадиям развития. Такой подход можно использовать в качестве дополнения к другим методам борьбы с биопленками — например, нанесения на поверхности наноструктурированных покрытий, препятствующих прикреплению к ним бактерий.

Нездоровое прикрепление

Войну с бактериями можно начать, лишив их возможности связываться с субстратом. Многие исследования были посвящены разработке материалов или покрытий, способных убивать микробов при контакте с ними. Этого можно достичь за счет использования покрытий или импрегнированных поверхностей, обеспечивающих высвобождение высоких концентраций антибактериальных веществ. Некоторые типы таких поверхностей уже широко применяются в больницах и включают пропитанные антибиотиками шовные материалы, костный цемент с пропитанными антибиотиками

«бусинами», а также катетеры, повязки и эндотрахеальные трубки с покрытием из коллоидного серебра или серебряных наночастиц. Ионы серебра убивают бактерий при контакте. Механизмы этого феномена выяснены не до конца, но, как известно, ионы серебра вызывают окислительные повреждения бактериальных клеток, приводящие к их гибели. Помимо серебра клинические испытания проходят оксиды и соли некоторых других металлов — железа, ртути, теллура, цинка, титана и т.д.

Применение покрытий и импрегнированных поверхностей, однако, имеет существенный недостаток: запасы противомикробных веществ в них

в конце концов истощаются. Это обстоятельство, а также озабоченность медиков злоупотреблением антибактериальными препаратами и последующим развитием устойчивости к ним бактерий, стимулировали разработку новых типов поверхностных материалов, которые контролируют прикрепление микробов механическими способами. На создание таких поверхностей ученых вдохновила сама природа: данные покрытия имитируют текстуру акулей кожи, текстуру самоочищающейся поверхности листьев лотоса или химические процессы, используемые мидиями для отпугивания бактерий. Такие поверхности могут и не предотвращать при-



Сила в единении: *бациллы (палочковидные бактерии) обволакивают себя защитным матриксом (микрофотография)*

крепление бактерий к субстрату, но они выводят из строя белки, которые микробы используют в качестве прикрепительных платформ. Это достигается за счет увеличения микроскопической шероховатости поверхности благодаря присутствию наноструктур типа щеточек, кристаллов или трубочек, состоящих из полимеров, способных связывать молекулы воды, например полиэтиленгликоля (ПЭГ) или соединений, известных под названием цвиттерных полимеров.

Атака матрикса

Несмотря на многообещающие результаты использования «противопленочных» поверхностей, для борьбы с бактериями, против которых этот барьер оказывается неэффективным, требуются иные методы и стратегии. В таком случае мишенью ученых становится окружающий биопленки слизистый матрикс. Эта субстанция, состоящая из длинных цепочек полисахаридов, белков и ДНК, выполняет несколько функций. Во-первых, она защищает бактерии от пагубных внешних

воздействий. Матрикс предотвращает или ограничивает проникновение в толщу биопленки антибиотиков и антител (белков иммунной системы), не давая им добираться до бактерий. Кроме того, матрикс служит своего рода каркасом, «склеивающим» бактериальное сообщество в единое целое и удерживающим его на поверхности субстрата. А значит, устранение этой субстанции вполне может привести к утрате сообществом бактерий структурной целостности и его последующему коллапсу (распаду). Когда такое происходит, высвободившиеся бактериальные клетки вновь становятся уязвимыми к лекарствам и защитным факторам иммунной системы.

Матрикс можно разрушить с помощью ферментов — белков, ускоряющих химические реакции. К сожалению, состав такой субстанции, а точнее типы присутствующих в ней белков и полисахаридов, у различных бактерий сильно варьируют, так что для разрушения каждого типа матрикса требуется особый фермент. А потому в каждом отдельном случае способ разрушения белков и полисахаридов матрикса должен подбираться с учетом типа бактерии, образовавшей пленку.

Более уязвимая мишень — присутствующая в матриксе ДНК: это «универсальное» соединение можно разрушить с помощью одного-единственного фермента — ДНКазы I. Сейчас возможность использования ДНКазы I проверяется в нескольких клинических испытаниях; оценивается ее эффективность (в сочетании с антибиотиками) при лечении среднего отита (воспаления среднего уха) и других хронических инфекций, связанных с образованием биопленок. ДНКазы I уже широко применяются при лечении пациентов с кистозным фиброзом, которое приводит к значительному улучшению функций легких.

Разделять и властвовать!

Наблюдения за развитием биопленок породили и иные по своей природе стратегии борьбы с этими образованиями. Сформированная бактериями биопленка может распадаться в результате так называемой дисперсии — отщепления от нее отдельных клеток. Дисперсия происходит, например, когда внутри биопленки истощаются запасы питательных веществ, когда микробам в ней становится слишком тесно или когда окружающая среда становится нестабильной. Распад биопленки позволяет выжить составляющим ее организмам и дает им возможность дать начало новым сообществам бактерий в других местах.

Но одиночные клетки, отрывающиеся от биопленки, по сути дела представляют собой те же самые беззащитные бактерии, с которыми уже давно научилась бороться медицина. Но как заставить пленкообразующие бактерии изменить привычный стиль жизни и начать отщепляться

от биопленки? Ученые уже обнаружили ряд факторов, способных инициировать данный процесс. Во-первых, сами бактерии, похоже, могут сообщать другим членам биопленочного сообщества о необходимости дисперсии. Исследования синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) — бактерии, часто используемой для экспериментального изучения образования биопленок и выступающей причиной множества внутрибольничных и хронических инфекций, — показали, что эти микробы вырабатывают цис-2-деценую кислоту (цис-ДК) — жирную кислоту, с помощью которой они сообщают другим членам бактериальной колонии о том, что пришла пора «разбежаться» в разные стороны. В ряде экспериментов было обнаружено, что цис-ДК оказывает такое же действие и на биопленки, образованные другими бактериями. К настоящему времени установлено, что цис-ДК индуцирует дисперсию биопленок пяти различных видов бактерий и дрожжей.

Распад бактериальной пленки могут вызывать и некоторые внешние факторы. Природа этих триггеров очень разнообразна (увеличение концентрации тяжелых металлов в окружающей среде, уменьшение уровня кислорода и т.д.), но все они вызывают дисперсию за счет снижения уровня универсального внутриклеточного сигнального соединения — циклического ди-гуанозинмонофосфата (ди-ГМФ). Уровень циклического ди-ГМФ определяет степень прилипания бактерий к поверхностям: самый высокий его уровень характерен для биопленок, растущих на поверхности субстрата и активно вырабатывающих матрикс, а самый низкий — для бактерий, существующих в виде одиночных клеток. Хотя падение уровня циклического ди-ГМФ при воздействии упомянутых выше факторов обуславливал более чем 80-процентное снижение биомассы микробных пленок, далеко не все эти триггеры пригодны для использования в медицинских клиниках.

Один из подходящих кандидатов — бесцветный газ оксид азота («веселящий газ»). С его помощью наша иммунная система отбивается от микробных пришельцев; кроме того, он используется в медицине для улучшения оксигенации пациентов с различными формами легочной гипертензии (например, при хронической обструктивной болезни легких). Как показали лабораторные исследования, оксид азота способствует дисперсии биопленок, образованных широким спектром бактерий. Сам по себе он сокращает биомассу бактериальных пленок в среднем на 63%, а в сочетании с противомикробными препаратами (например, колистином) может почти полностью разрушать биопленки в лабораторных экспериментах.

Тем не менее, несмотря на обнадеживающие результаты, использование оксида азота сопряжено с рядом клинических проблем. Поскольку его

проникновение в обширные области тела может вызывать токсические эффекты, важное значение приобретает возможность его доставки лишь к месту инфекции, а добиться этого в случае газов очень трудно. Чтобы сделать использование оксида азота более безопасным, ученые разработали ряд специальных препаратов и устройств. Один из примеров — цефалоспорин-3'-диазений-диолат. Этот комплексный препарат состоит из антибиотика цефалоспорины и вещества, образующего оксид азота и активируемого только при контакте с бактериальными клетками, содержащими фермент бета-лактамазу. Как правило, этот фермент имеют бактерии, резистентные к таким антибиотикам, как пенициллин и ампициллин.

Обнаружить и заразить!

Еще одна стратегия борьбы с биопленками — заражение образующих их бактерий летальными инфекциями. Бактерии, как и люди, восприимчивы к вирусам, называемым бактериофагами или попросту фагами. Для людей фаги неопасны, но они заражают и убивают бактерий. С тех пор как в 1996 г. было впервые изучено взаимодействие фагов с биопленками, усилия многочисленных исследователей были направлены на поиск фагов, способных убивать бактерий внутри биопленок. Кроме того, фаги, заражающие, но не убивающие бактериальные клетки, могут быть использованы в качестве средства доставки антибиотиков или агентов, разрушающих матрикс (например, ДНКазы I), к находящимся внутри пленки бактериям. В ряде стран фаговая терапия уже используется для лечения легочных инфекций, связанных с образованием биопленок, у пациентов с кистозным фиброзом.

Но проблемы возникают при использовании и этого терапевтического метода. Поскольку фаги заражают и убивают бактерий с высокой степенью специфичности, их нельзя применять в качестве убийц микробов широкого спектра. Кроме того, бактерии могут приобрести устойчивость к фагам, подобно тому как они становятся резистентными к антибиотикам.

Для решения проблем, связанных с развитием у бактерий устойчивости к противомикробным агентам, ученые решили использовать в качестве носителей этих губительных грузов липосомы — микроскопические пузырьки, окруженные одним или несколькими слоями липидов (жиров). Эти наночастицы должны доставлять соединения, убивающие микробов или дестабилизирующие биопленки (антибиотики, другие антибактериальные препараты или ферменты, разрушающие матрикс), непосредственно туда, где они нужны больше всего — внутрь биопленок или прямо к бактериям. Механизм направленного транспорта данных соединений основан на липидном

составе липосом, имитирующем липидный состав мембран бактериальных клеток. Такое сходство позволяет липосомам диффундировать в матрикс, сливаться с бактериями и выплескивать свое содержимое в клетки микробов. Преимущество подобной стратегии состоит в направленной доставке соединений: антибактериальные и противобактериальные препараты транспортируются только к биопленкам и никуда больше. Сегодня липосомы уже широко используются в качестве системы транспорта противомикробных лекарств.

Выигрышная комбинация

Помимо описанных мною стратегий ученые пытаются создавать и иные подходы, направленные на предотвращение образования биопленок и ограничение их роста. Одни из них находятся на ранних стадиях разработки, другие уже проходят клинические испытания. Это свидетельствует о важности борьбы с биопленками и о том, как трудно манипулировать данными образованиями. Одна из главных проблем связана с невероятным разнообразием биопленок. Каждый вид бактерий образует биопленку немного иначе, чем другие; разные виды бактерий вырабатывают различные матриксы, сигнальные молекулы для общения друг с другом, разные типы белков и т.д. Но мы тщательно регистрируем все эти различия и мало-помалу накапливаем знания, необходимые для разработки эффективных методов лечения. И совсем не исключено, что для окончательной победы над этим грозным врагом потребуются комбинированное использование самых разных стратегий. ■

Перевод: А.В. Щеглов

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИСТОЧНИКИ

- Циммер К. Слабое звено в цепи бактериальной защиты // ВМН, № 3, 2015.
- Initiation of Biofilm Formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Proceeds via Multiple, Convergent Signalling Pathways: A Genetic Analysis. George A. O'Toole and Roberto Kolter in *Molecular Microbiology*, Vol. 28, No. 3, pages 449–461; April 1998.
- Biofilms as Complex Differentiated Communities. P. Stoodley, K. Sauer, D.G. Davies and J.W. Costerton in *Annual Review of Microbiology*, Vol. 56, pages 187–209; October 2002.
- Cephalosporin-3 -diazaniumdiolates: Targeted NO-Donor Prodrugs for Dispersing Bacterial Biofilms. Nicolas Barraud et al. in *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 51, No. 36, pages 9057–9060; September 3, 2012.
- Antimicrobial Activity of Metals: Mechanisms, Molecular Targets and Applications. Joseph A. Lemire, Joe J. Harrison and Raymond J. Turner in *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 11, No. 6, pages 371–384; June 13, 2013.
- Escaping the Biofilm in More Than One Way: Desorption, Detachment or Dispersion. Olga E. Petrova and Karin Sauer in *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 30, pages 67–78; April 2016.