

Морфологические аспекты формирования микробной биопленки на фрагментах атеросклеротических бляшек пациентов

В.Н.Царёв, Е.Н.Николаева, М.В.Витович, М.С.Подпорин, Е.В.Ипполитов

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова», Москва, Российская Федерация

Современные исследования свидетельствуют о наличии в атеросклеротических бляшках живых бактерий. Однако потенциал микробов в образовании биопленок в артериальных бляшках не изучен.

Цель исследования. Выявление биопленок на фрагментах артериальных сосудов с атеросклеротическими бляшками.

Материалы и методы. Фрагменты атеросклеротических бляшек, удаленные при аортокоронарном шунтировании больных ишемической болезнью сердца, культивировали в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях *in vitro* в течение 1 или 14 суток. Наличие биопленок оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. Во всех фрагментах атеросклеротических бляшек после культивирования *in vitro* выявлены смешанные биопленки, представленные бактериями палочковидной и кокковой форм. Характерная ультраструктура позволила выявить основные этапы жизненного цикла биопленки.

Выводы. Моделирование биопленок на биотических поверхностях в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях позволяет подробно изучить фенотип биопленок и обеспечить существенное понимание патофизиологии инфекционных процессов в кровеносных сосудах и атеросклеротических бляшках.

Ключевые слова: атеросклеротическая бляшка, биопленкообразующие микробы, пародонтопатогены, возбудители нозокомиальных инфекций, технология текучих сред

Для цитирования: Царёв В.Н., Николаева Е.Н., Витович М.В., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В. Морфологические аспекты формирования микробной биопленки на фрагментах атеросклеротических бляшек пациентов. Бактериология. 2020; 5(2): 8–17. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-8-17

Morphological aspects of microbial biofilm formation on atherosclerotic plaque fragments

V.N.Tsarev, E.N.Nikolaeva, M.V.Vitovich, M.S.Podporin, E.V.Ippolitov

Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Modern research indicates the presence of living bacteria in atherosclerotic plaques. However, the potential of microbes in the formation of biofilms in arterial plaques has not been studied.

Purpose of the study. Identification of biofilms on fragments of arterial vessels with atherosclerotic plaques.

Materials and methods. Fragments of atherosclerotic plaques isolated during coronary artery bypass grafting in patients with coronary artery disease were cultured in an exhaustive fluid system under anaerobic conditions *in vitro* for 1 or 14 days. The presence of biofilms was evaluated using scanning electron microscopy.

Results. Mixed biofilms, represented by rod-shaped bacteria and cocci, were identified after *in vitro* cultivation in all fragments of atherosclerotic plaques. The characteristic ultrastructure revealed the main stages of the biofilm life cycle.

Conclusions. Modeling biofilms on biotic surfaces in a system of exhausted fluids under anaerobic conditions will allow us to study in detail the phenotype of biofilms and provide a significant understanding of the pathophysiology of infectious processes in blood vessels and atherosclerotic plaques.

Key words: atherosclerotic plaque, chronic periodontitis, biofilm-forming microbes, periodontal pathogens, causative agents of nosocomial infections, fluid technology

For citation: Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Vitovich M.V., Podporin M.S., Ippolitov E.V. Morphological aspects of microbial biofilm formation on atherosclerotic plaque fragments. Bacteriology. 2020; 5(2): 8–17. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-8-17

Для корреспонденции:

Николаева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

Телефон: (495) 609-6700

E-mail: elnikolaeva@bk.ru

Статья поступила 30.07.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

For correspondence:

Elena N. Nikolaeva, MD, PhD, DSc, professor, chief researcher in the molecular biology research laboratory of the Medical Dental Research Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry

Address: 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation

Phone: (495) 609-6700

E-mail: elnikolaeva@bk.ru

The article was received 30.07.2020, accepted for publication 15.09.2020

Концепции формирования микробных биопленок уделяется большое внимание при оценке патологии внутренних органов инфекционного и неинфекционного генеза. Биопленка представляет собой «структурированный консорциум микробных клеток, окруженный полимерной матрицей, продуцируемой самими микробами» [1]. В матрицу биопленки помимо микробов могут быть интегрированы компоненты организма-хозяина, такие как фибрин, тромбоциты или иммуноглобулины. Как бактерии, так и грибы могут вызывать биопленочные инфекции, а биопленки могут состоять из микробов одного вида или быть полимикробными [1–5].

Биопленочные инфекции характеризуются хронической, персистирующей и постепенно прогрессирующей патологией, обусловленной прежде всего воспалительной реакцией в участках, окружающих биопленку. По этой причине многие из них трудно диагностировать и эффективно лечить [6].

Размеры биопленок обычно малы *in vivo*, в тканях 4–200 мкм, на инородных телах 5–1200 мкм [7]. В связи с этим поиск биопленок в клинических образцах может быть трудным и длительным и приводить к ложноотрицательным результатам, если образцы не представляют очаг инфекционной биопленки. Современные исследования свидетельствуют о возможном наличии в атеросклеротических бляшках живых бактерий [8–11]. Однако потенциал микробов в образовании биопленок в артериальных бляшках мало изучен.

Цель исследования: выявление микробных биопленок на фрагментах артериальных сосудов с атеросклеротическими бляшками у пациентов кардиологического профиля.

Материал и методы

Исследуемый материал (фрагменты сосудов) получали во время проведения аортокоронарного шунтирования, связанного с атеросклеротическим поражением, и немедленно помещали в стерильные транспортные системы со средой AmiesTransport, контрольные образцы – в 10%-й раствор нейтрального формалина. Пробирки с выделенными фрагментами доставляли в течение 2 ч в лабораторию молекулярно-биологических исследований МГМСУ и лабораторию анатомии микроорганизмов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ.

Исследуемые образцы:

1. отобраны интраоперационно и фиксированы в 10%-м растворе нейтрального формалина (контрольные),
2. культивированы в системе истощаемых текучих сред и анаэробных условиях 1 сутки, после чего также фиксированы в формалине,
3. культивированы в системе истощаемых текучих сред и анаэробных условиях 14 суток, затем фиксированы в формалине.

Макроскопически определяемую внутреннюю поверхность сосуда анализировали с помощью электронного микроскопа. При наличии на внутренней поверхности образца области желтого цвета, в которой предположительно была сформирована атеросклеротическая бляшка, острым лезвием отсекали как фрагмент желтого цвета, так и рядом расположенную область белого цвета.

Участки сосудов с атеросклеротическими бляшками (№2, №3), доставленные в стерильных транспортных системах со средой AmiesTransport, использовали для получения отпечатка на плотной питательной среде M832, а затем помещали в жидкую питательную среду M863 для селективного выделения неспоровых анаэробов (FD001, HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Анаэрогат (HiAnaerobic System Mark VI) с посевами в бескислородной газовой смеси: H₂ (10%), CO₂ (10%) N₂ (80%) помещали в орбитальный шейкер-инкубатор «ES-20» (Biosan, Латвия) и инкубировали при температуре 36,9°C, скорости вращения 90 об./мин в течение 1 и 14 дней согласно патенту РФ [12].

Для контроля стерильности забора исследуемого материала и условий культивирования проводили посев на плотную питательную среду M832 транспортной среды, в которой были доставлены образцы в лабораторию; чашку Петри с питательной средой M832 и флакон с жидкой питательной средой M863 без посева.

Микротопографию биопленок оценивали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), которую проводили согласно методике, описанной Диденко Л.В. и соавт. (2015) [13]. Фиксированные в 10%-м растворе нейтрального формалина фрагменты сосудов высушивали при комнатной температуре в течение 10 мин, монтировали на алюминиевые столики с помощью угольного клея и напыляли золотом (толщина слоя 10 нм) в установке «SPI-MODULE SputterCoater» (SPI Supplies, США). Анализ образцов проводили с помощью сканирующего двулучевого электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEICompany, США) в режиме высокого вакуума, при ускоряющем напряжении 5 кВ.

Исследование являлось предварительным и не носило сравнительного характера, поэтому для анализа результатов использованы методы описательной статистики.

Результаты и обсуждение

Проведено культивирование в системе с истощаемой текучей средой и анаэробных условиях фрагментов атеросклеротических бляшек, выделенных у 12 больных ИБС и хроническим пародонтитом, в возрасте от 54 до 74 лет, находившихся на хирургическом лечении в Институте коронарной и сосудистой хирургии Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева.

Бактериальный рост в контрольных посевах отсутствовал. Тем не менее на внутренней поверхности интраоперационно фиксированных формалином образцов выявлены единично расположенные бактерии.

На рис. 1 представлен участок внутренней поверхности контрольного образца с единичными бактериями овоидной формы. На другом участке этого же образца видно несколько бактерий, расположенных в виде короткой цепочки (рис. 2).

Можно предположить, что наличие микробов на внутренней поверхности интраоперационно фиксированного образца свидетельствует о случайной адгезии бактерий в результате бактериемии либо о нахождении бактерий в атеросклеротической бляшке. Попадание бактерий из воздуха во время операции либо внесение микробов инструментами при последующих манипуляциях, связанных с приготовлением препарата для СЭМ, маловероятно вследствие строгого

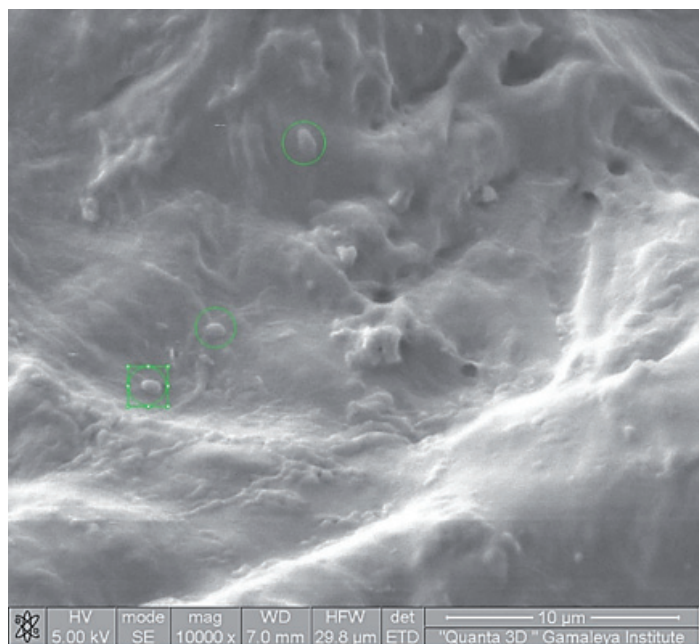


Рис. 1. СЭМ внутренней поверхности интраоперационно фиксированного кровеносного сосуда, $\times 10\ 000$ (образец №1).

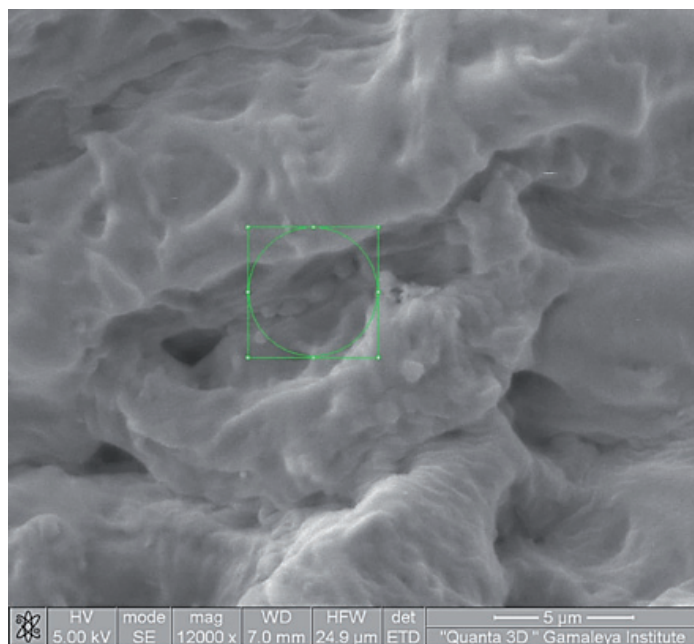


Рис. 2. СЭМ внутренней поверхности образца №1, $\times 12\ 000$.

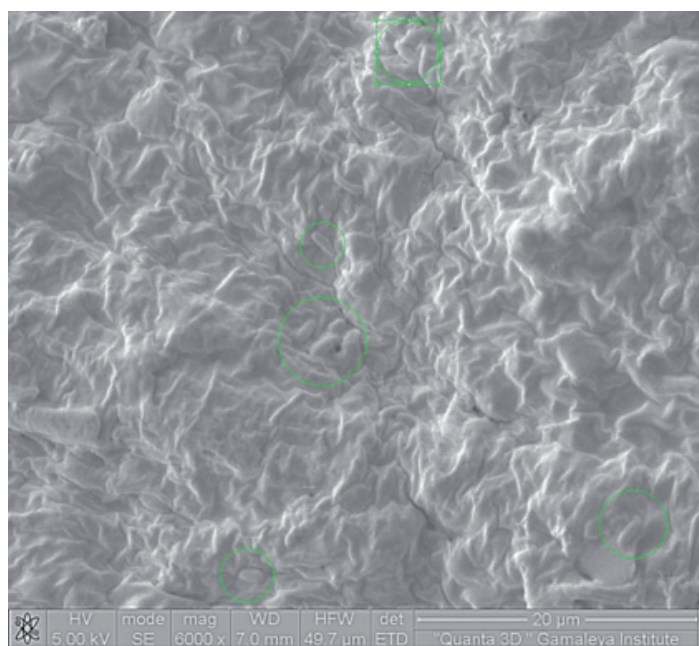


Рис. 3. СЭМ поверхности образца №2 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, $\times 6000$.

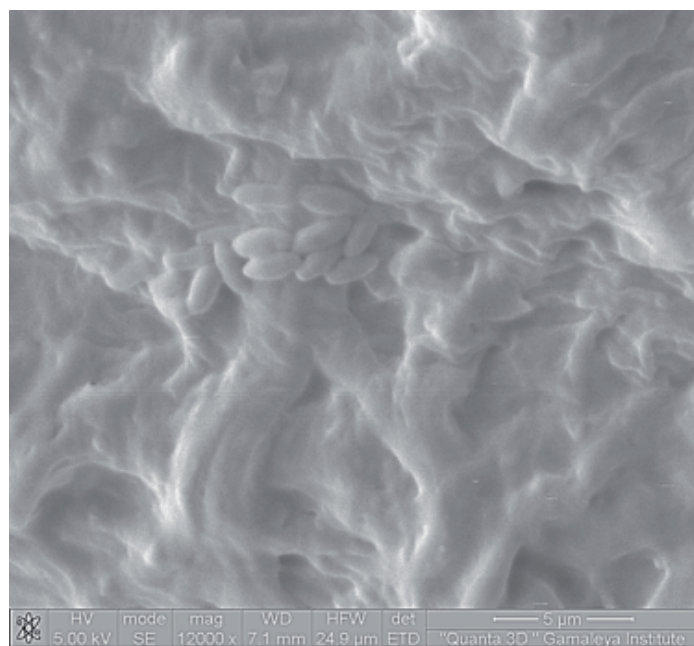


Рис. 4. СЭМ поверхности образца №2 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, $\times 10\ 000$.

соблюдения условий асептики, а также явного расположения цепочки микробов в углублении кровеносного сосуда.

Во флаконах с фрагментами атеросклеротических бляшек наблюдалось помутнение питательной среды через 24 ч культивирования и наличие осадка на дне пробирки, свидетельствующие о появлении в них планктонных форм микробов. На поверхности образца №2 (24 ч инкубации) обнаружены единичные бактерии и их скопления, а также бактерии, покрытые гомогенным веществом (рис. 3). Выявлены участки микроколоний (отличительный признак образования биопленок с помощью автоагрегации бактерий на поверхности).

Морфологически отличить экзополисахаридный матрикс биопленки бактерий от внеклеточного матрикса ткани дан-

ного сосуда не представлялось возможным. Бактерии имели овоидную и палочковидную форму. Их размеры варьировали от 1,90 до 2,50 мкм (рис. 3–5).

На поверхности фрагмента сосуда №3 выявлены участки с отдельно лежащими бактериями, частично покрытые экзоклеточным матриксом (рис. 6, 7). Но большей частью поверхность этого сосуда была покрыта биопленкой с выраженной мантией (рис. 8).

Фрагмент сосуда №4 был покрыт смешанной биопленкой с выраженным внеклеточным матриксом (рис. 9, 10).

Встречались области биопленки со скоплениями бактерий, матриксом не покрытые (рис. 11).

Свободные от матрикса бактерии имели множественные инвагинации клеточной оболочки (рис. 12).

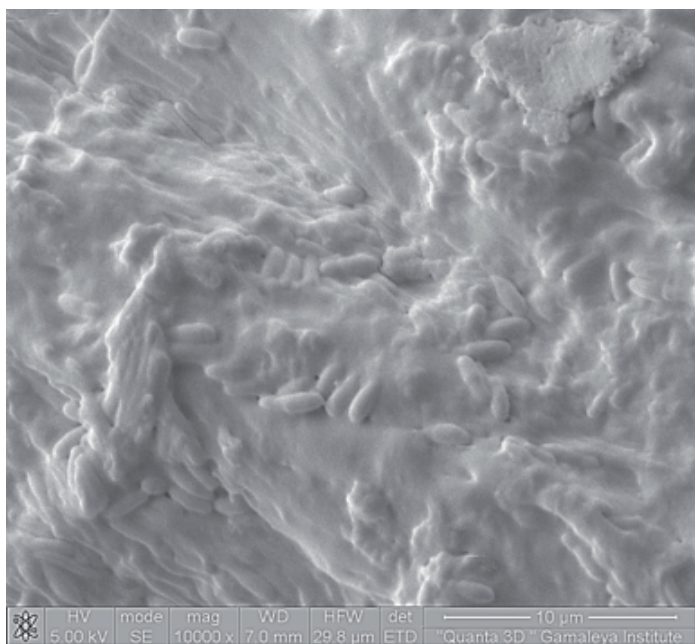


Рис. 5. СЭМ участка образца №2 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, $\times 10\,000$.

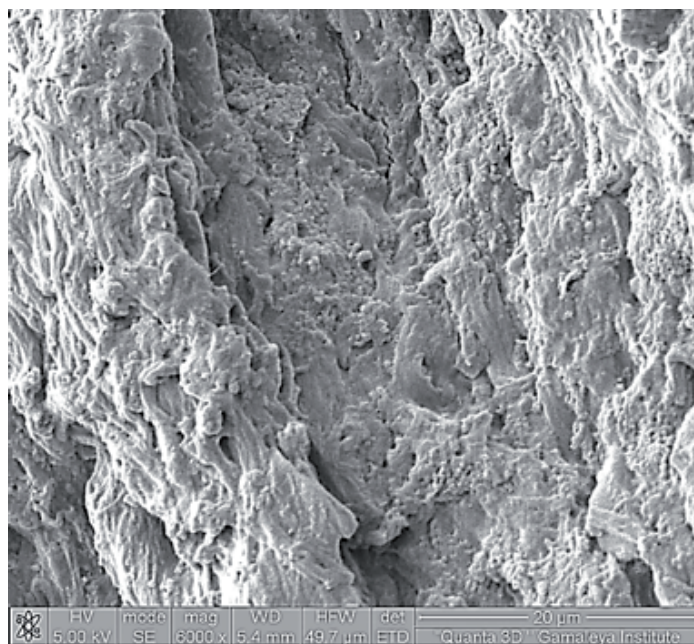


Рис. 6. Рельеф поверхности сосуда №3 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, $\times 6000$.

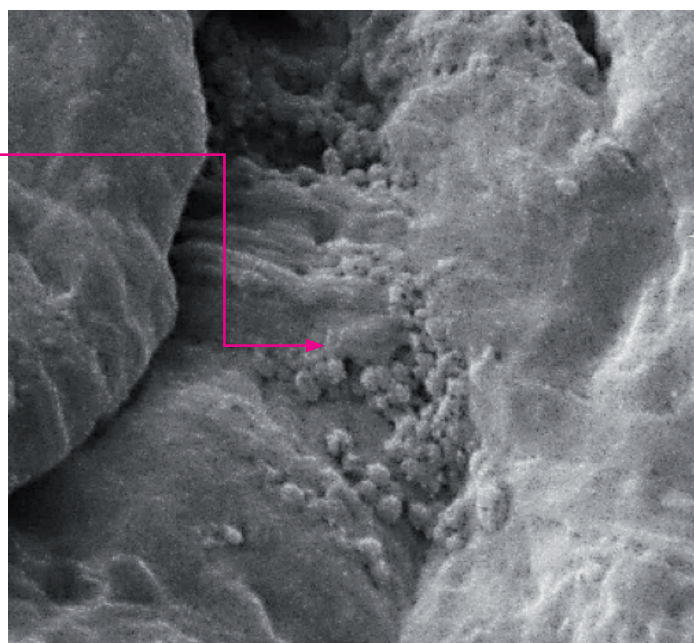
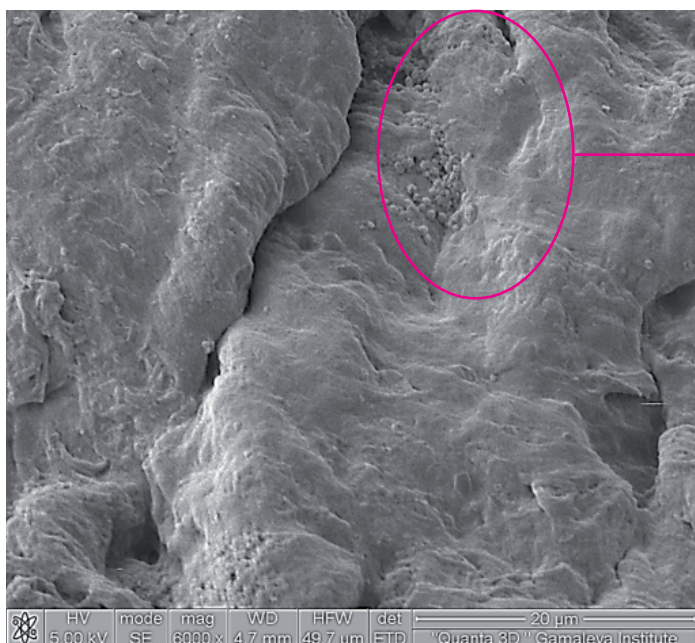


Рис. 7. СЭМ поверхности образца сосуда №3 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, $\times 6000$ и $\times 10\,000$.

Следовательно, на поверхности культивируемых биоптатов наблюдался рост микробов, образующих биопленку. Участки с поверхностно расположенными бактериями, не покрытые экзоклеточным матриксом, по-видимому, связаны с их дальнейшим распространением в планктонной форме. Фрагменты зрелых биопленок могут отслаиваться и растрескиваться. Наличие полых пустот также свидетельствует о формировании зрелой биопленки [14, 15].

На поверхности фрагмента сосуда №5, культивированного в течение 14 суток в системе с текучей истощаемой средой в анаэробных условиях, в области белого цвета также выявлена смешанная биопленка с выраженной экзоклеточной мантией (рис. 13–15).

Особенностью фрагмента, изображенного на рис. 13, являются кальцинаты, свободные от бактерий.

Таким образом, на поверхностях всех образцов из атеросклеротических бляшек были выявлены многочисленные участки бактериальной биопленки. Они имели смешанный характер, т.е. были представлены разнообразными морфологическими вариантами микробиоты: бактериями палочковидной, овоидной и кокковой форм. Размеры палочковидных бактерий варьировали от 1,14 до 2,42 мкм ($1,71 \pm 0,35$ мкм). Встречались участки смешанной биопленки, состоящей из кокков и палочек, некоторые из которых достигали 3,5–5,15 мкм. Размеры овоидных клеток варьировали в пределах 700,26–785,54 нм ($745,15 \pm 24,24$ нм), а кокков – от 267,12 до 578,43 нм ($396,81 \pm 99,64$ нм).

Типичный экзоклеточный матрикс выявлен в образцах сосудов №4 и №5. Скопления бактерий, не покрытых матриксом, обнаружены в образце №3. Для представленных в этом

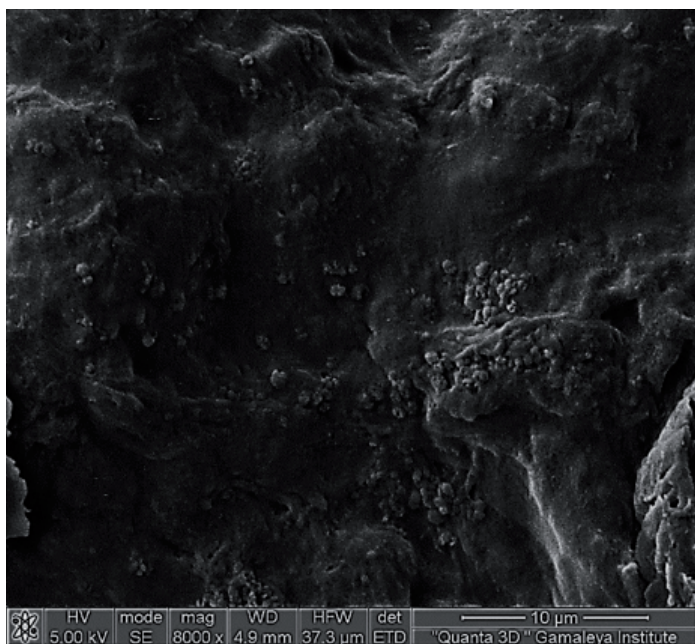


Рис. 8. СЭМ поверхности образца сосуда №3 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, ×8000.

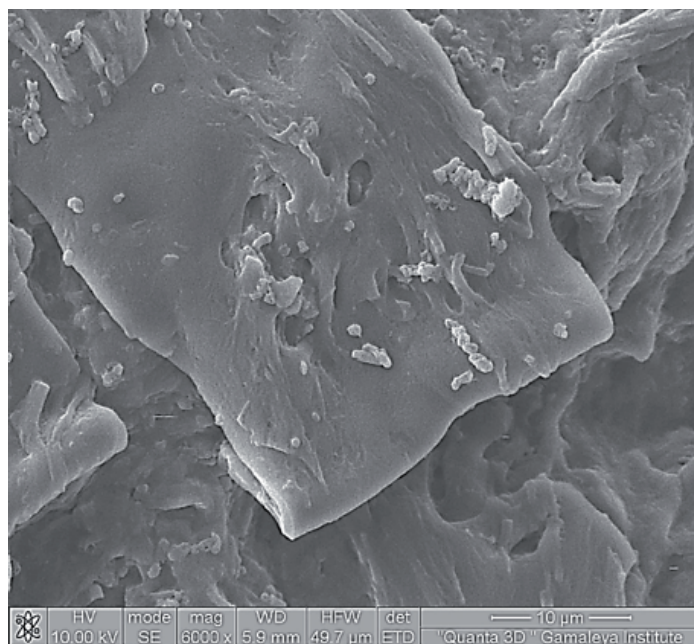


Рис. 9. Рельеф поверхности сосуда №4 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, ×6000.

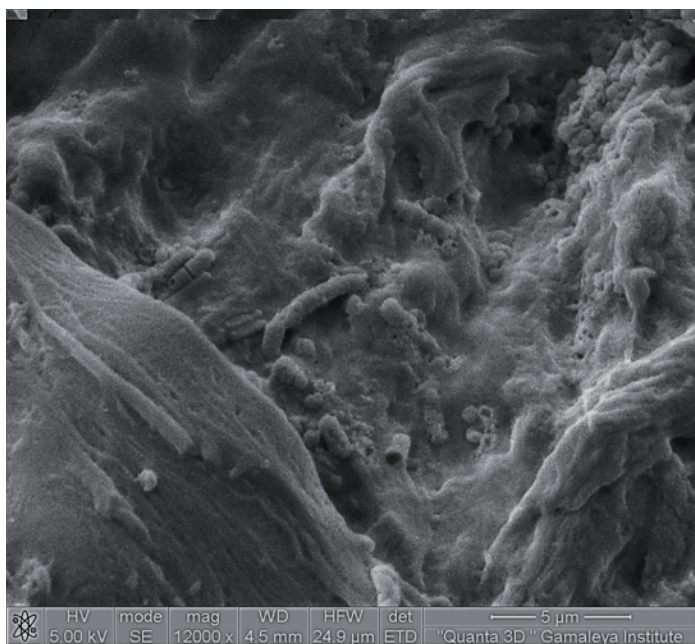


Рис. 10. Поверхность сосуда №4 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, ×8000.

образце микробов были характерны наиболее выраженные изменения их структурной организации. Несмотря на разницу макроскопической картины отдельных фрагментов образца №5, во всех участках было выявлено наличие биопленки с характерной ультраструктурой.

Обширные исследования позволили оценить жизненный цикл биопленки, который включает три основных этапа: (а) начальная адгезия, (б) накопление и (в) дисперсия [16].

Условием образования биопленки, кроме присутствия микробов, является наличие относительно плотной и увлажненной поверхности неорганического или органического происхождения [17]. Соответственно, поверхность кровеносных сосудов удовлетворяет этому условию.

На представленных нами микрофотографиях можно проследить элементы классических этапов образования биопленок.

Это адгезия одиночных бактерий к поверхности (образец №1). Колонизация – межклеточная адгезия и образование микроколоний с начальным этапом синтеза экзоклеточного матрикса (образец №2). Созревание и формирование сложных полимикробных биопленок (образец №3). Выделение или дисперсия планктонных форм микробов в окружающую (в нашем случае – культуральную) среду (образцы №4 и №5).

Известно, что некоторые биопленки прилипают к естественным или искусственным поверхностям в организме (включая устройства), в то время как другие могут состоять из агрегатов, связанных, но не прилипших непосредственно к поверхности [3, 7]. По-видимому, микробы из подобных участков биопленки в нашей системе довольно быстро переходили в планктонную форму, хотя в последующем могли адгезировать на более подходящие для них участки.

Микробы с дефектной клеточной стенкой могут появляться в зрелых многоклеточных биопленках при индукции программируемой гибели клеток, включающей братоубийство, альтруистический аутолиз и, возможно, каннибализм при истощении питательных веществ [17, 18]. В подобных условиях бактериальная популяция, по-видимому, существует как многоклеточный организм, состоящий из субпопуляций с различными функциями, а гибель некомпетентной субпопуляции позволяет выживать бактериальному консорциуму в целом [19, 20].

Следует отметить, что бактерии с инвагинациями клеточной стенки наблюдались как на ранней стадии формирования биопленки (через 24 ч), так и на более поздней (14 суток культивирования).

Дисперсия биопленки является менее изученной стадией жизненного цикла биопленки. Тем не менее известно, что на активное высвобождение биопленочных клеток путем дис-

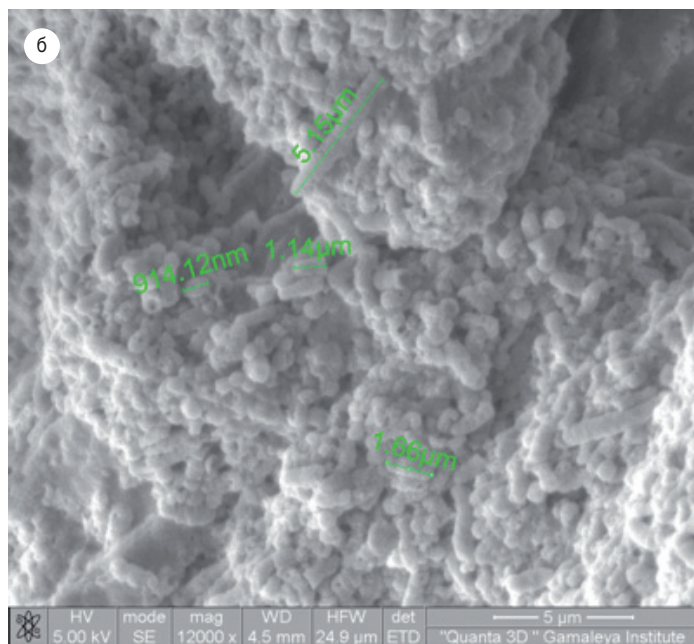
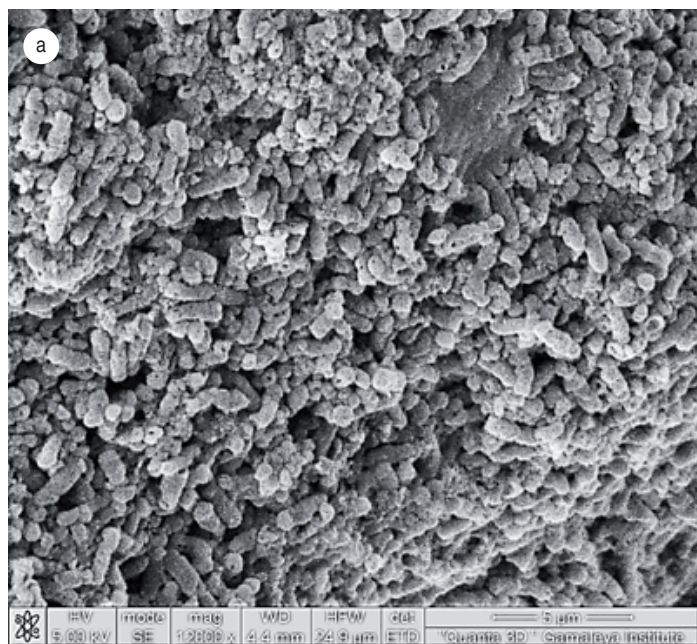


Рис. 11. Поверхность сосуда №4 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, ×12 000.

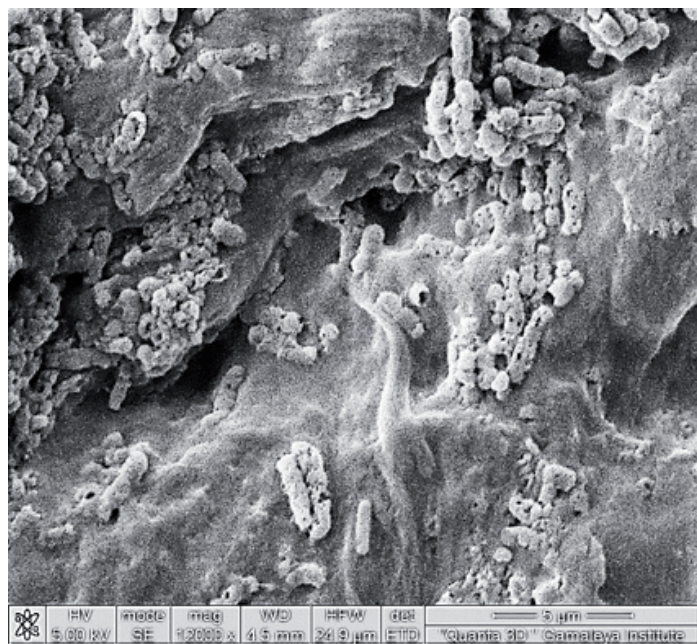


Рис. 12. СЭМ поверхности образца сосуда №4 после культивирования в системе текучих сред в течение 24 ч, ×12 000.

персии влияют факторы окружающей среды, включая колебания температуры и pH, накопление отходов, наличие питательных веществ и кислорода, межклеточную передачу сигнальных молекул [7]. Биопленки могут также высвобождать клетки в окружающую среду за счет сдвиговых сил, и этот пассивный процесс часто называют отслоением [21].

Клиническое значение микробов, растущих в виде биопленок, заключается в том, что их труднее выделить из клинических образцов, они физиологически гораздо более устойчивы к воздействию антибиотиков и дезинфицирующих средств [22]. Поэтому антибиотикотерапия, основанная на тестировании чувствительности планктонных бактерий, может быть связана с неудачным лечением или рецидивом инфекции [23]. Хотя в условиях разработанной нами систе-

мы можно сравнить влияние антимикробных препаратов на обе формы существования бактерий.

Некоторые микробы в биопленках могут быть жизнеспособными, но не культивируемыми при использовании обычных сред [24].

В этом случае предлагают использовать независимые от культивирования методы [25, 26]. Поскольку культуральный метод или не связанные с ним способы (например, полимеразная цепная реакция) не могут различать биопленочные и планктонные микроорганизмы, идентификация биопленок основана на микроскопическом обнаружении микробных агрегатов, расположенных в матрице.

Считается, что в идеале результаты микроскопии и культивирования должны быть количественными или полуколичественными, а микробы должны быть идентифицированы до уровня видов, чтобы помочь отличить примеси от нормальной микробиоты и инфекционных микроорганизмов, независимо от того, были ли они ранее связаны с биопленочными инфекциями [6].

Ранее мы показали, что во всех образцах, выделенных из этих атеросклеротических бляшек, идентифицирован генетический материал хотя бы одного вида микробиоты, включая ДНК пародонтопатогенов, некоторых возбудителей зоокомиальных инфекций, вирусов семейства *Herpesviridae* и *Candida* spp. [11, 27, 28]. С помощью метода культивирования в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях мы смогли подтвердить разнообразие жизнеспособной микробиоты в атеросклеротических бляшках. После их пересева на плотные питательные среды и из отпечатков фрагментов атеросклеротических бляшек были выделены и идентифицированы 4 штамма пародонтопатогенов (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis*), 21 штамм возбудителей гнойно-воспалительных инфекций (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis/aecium*, *Enterobacter* spp.) и 6 штаммов *Candida* spp., всего 31 штамм [10, 29]. Известно, что некото-

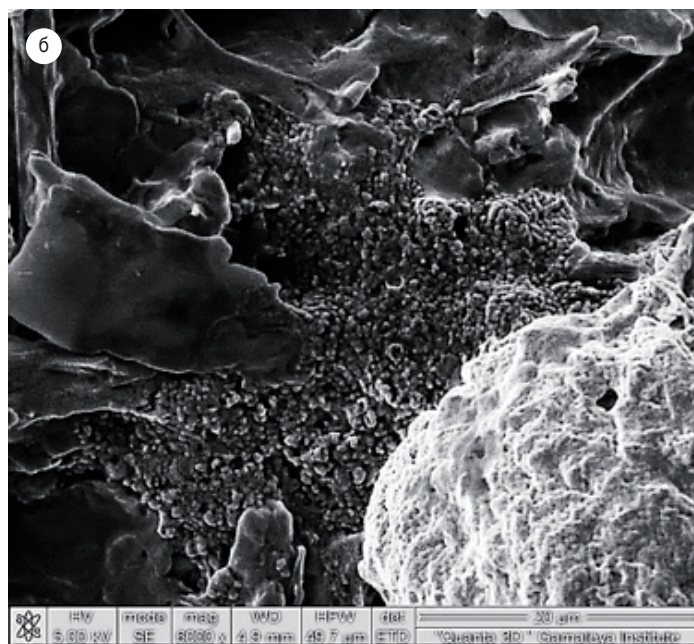
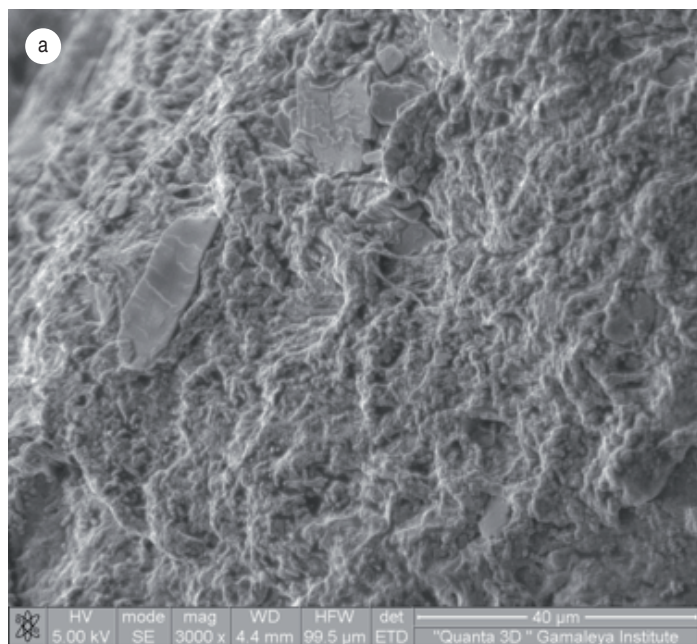


Рис. 13. Биопленка на поверхности сосуда №5, время культивирования 14 суток, ×6000.

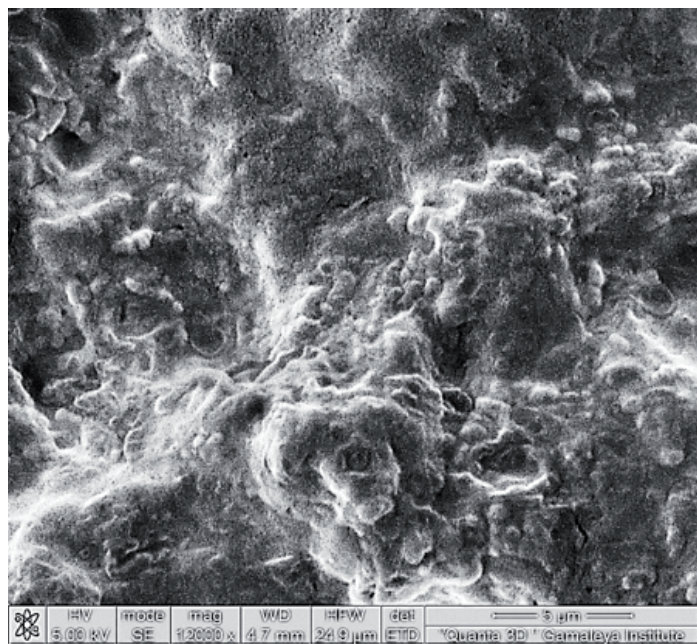


Рис. 14. Участок биопленки на поверхности сосуда №5 с выраженной экзоцеллюлярной мантией, время культивирования 14 суток, ×12 000.

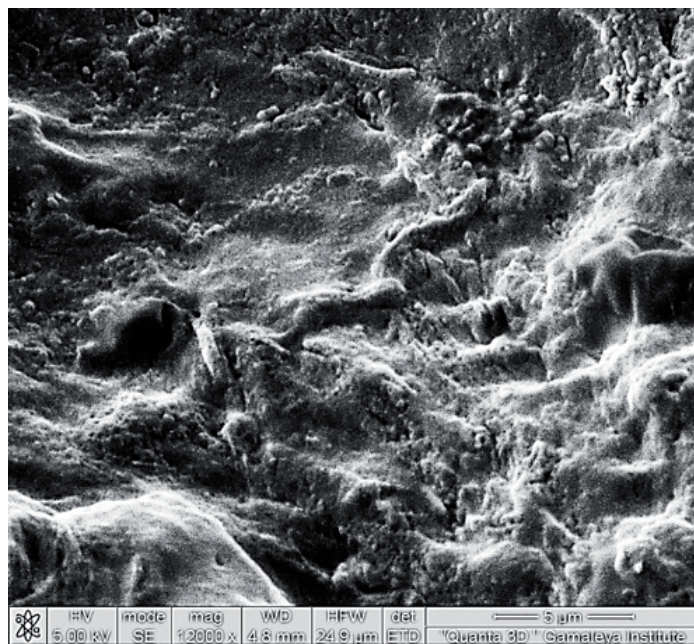


Рис. 15. Биопленка на поверхности сосуда №5 в участке бляшки белого цвета, время культивирования 14 суток, ×12 000.

рые представители нормальной микрофлоры могут образовывать биопленки (например, *Staphylococcus epidermidis* на внутривенных линиях или на ортопедическом аллопластическом материале) [4, 26].

Отметим, что Lanter V.B. et al. (2014) обнаружили в 15 образцах сонных артерий с атеросклеротическими бляшками последовательности рПНК зубактерий [9]. В каждой из 5 сонных артерий, исследованных более глубоко, имелись от 10 до 18 уникальных маркеров генов 16S рПНК, что указывало на колонизацию различными типами бактерий. С помощью зондов PNA-FISH (флуоресцентно-меченных специфических генов 16S рПНК зубактерий) были выявлены структуры, указывающие на присутствие микроколоний,

каждая из которых была ограничена по площади и содержала от нескольких десятков до нескольких сотен обнаруживаемых зондов-мишеней, в среднем диаметром около 1 мкм, указывающих на наличие бактерий. Авторы считают, что бактерии, обнаруженные в артериях, вероятно, вызывают образование бляшек. В частности, они предполагают, что бактерии существуют в виде биопленок, а внезапное распространение этих биопленок в планктонные формы бактерий является основной причиной острых сердечно-сосудистых заболеваний.

Snow D.E. et al. (2016), используя флуоресцентную микроскопию и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) для выявления компонентов биопленки, показали, что присут-

ствии биопленок в сильно склерозированных артериях может быть важным фактором в прогрессировании хронических воспалительных атеросклеротических процессов в ампутированных конечностях пациентов с диабетическими язвами стоп и сосудистыми заболеваниями [30]. По их мнению, хотя наличие бактериальных структур биопленки в атеросклеротической бляшке не доказывает, что именно биопленка является непосредственной причиной атеросклероза, она может способствовать постоянному ассоциированному с ней воспалению.

Заключение

Таким образом, моделируя биопленки на биотических поверхностях в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях, с использованием СЭМ и молекулярных методов можно изучить фенотип биопленок более подробно и полно, что позволяет детализировать понимание патофизиологии инфекционных процессов в кровеносных сосудах и атеросклеротических бляшках с участием микробного фактора. Применение метода культивирования микроорганизмов в системе истощаемых текучих сред в анаэробных условиях подтверждает разнообразие жизнеспособной микробиоты в атеросклеротических бляшках, включающей представителей факультативно- и облигатно-анаэробных видов бактерий, а также дрожжевых грибов рода *Candida*. Обнаружение в составе микробных биопленок атеросклеротических бляшек облигатно-анаэробных видов бактерий, в свою очередь, является аргументом в пользу исключения заноса микробов из воздушной среды операционной.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, Møller A, Bjarnsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65:127-45. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x
- Ramage G, Robertson SN, Williams C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:114-20. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.023
- Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens.* 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
- Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:791-808. DOI: 10.1038/nrd4000
- Окулич ВК, Плотников ФВ, Кабанова АА. Роль микробных биопленок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе. *Иммунология, аллергология, инфектология.* 2012;4:70-82.
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al, for the ESCMID Study Group for Biofilms (ESGB) and Consulting External Expert Werner Zimmerli ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections, 2014. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:S1-S25. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024
- Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sorensen SR, Moser C, Kuhl M, et al. The *in vivo* biofilm. *Trends Microbiol.* 2013 Sep;21(9):466-74. DOI: 10.1016/j.tim.2013.06.002
- Шарифуллина ДМ, Васильева ПМ, Яковлева ТИ, Николаева ЕГ, Поздеев ОК, Ложкин АП, Хайруллин РН. Микробный пейзаж биоплатов атеросклеротических бляшек. *Казанский медицинский журнал.* 2015;96(6):979-82. DOI: 10.17750/KMJ2015-979
- Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio.* 2014;5(3):e01206-14. DOI: 10.1128/mBio.01206-14. PMID: 24917599
- Витович МВ. Выделение и идентификация биопленкообразующих микробов в атеросклеротических бляшках. *Материалы V Национального конгресса бактериологов.* М.: Династия; 2019, с. 22-23.
- Tsarev VN, Nikolaeva EN, Vitovich MV. Identification of biofilm-forming microbes in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular diseases. *Process Management and Scientific Developments.* Birmingham, UK. 2020;90-7. DOI: 10.34660/INF.2020.4.52976
- Ипполитов ЕВ, Царёв ВН, Арутюнов СД, Степанов АГ, Подпорин МС, Шишова ВГ, Малазония ТТ. Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред *in vitro*. Патент RU №2619169, действ. с 20.11.2015.
- Диденко ЛВ, Автандилов ГА, Смирнова ТА, Шевлягина НВ, Царёв ВН, Лебедево ИЮ, и др. Исследование процессов колонизации и персистенции микроорганизмов на искусственных материалах медицинского назначения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2015;5:64-9.
- Ипполитов ЕВ, Диденко ЛВ, Царёв ВН. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015;60(12):59-64.
- Ramos JN, Souza C, Faria YV, da Silva EC, Veras JFC, Baio PVP, et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):672. DOI: 10.1186/s12879-019-4294-7
- Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:555-67. DOI: 10.1038/nrmicro2182
- Окулич ВК, Кабанова АА, Плотников ФВ. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. *Витебск: ВГМУ;* 2017, 300 с.
- Popp PF, Mascher T. Coordinated Cell Death in Isogenic Bacterial Populations: Sacrificing Some for the Benefit of Many? *J Mol Biol.* 2019;431(23):4656-69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.024
- Durand PM, Barreto Filho MM, Michod RE. Cell Death in Evolutionary Transitions in Individuality. *Yale J Biol Med.* 2019;92(4):651-62. PMID: 31866780. PMCID: PMC6913816
- Ikryannikova LN, Kurbatov LK, Soond SM, Zamyatnin AA Jr. Harnessing the Potential of Killers and Altruists within the Microbial Community: A Possible Alternative to Antibiotic Therapy? *Antibiotics.* 2019;8:230. DOI: 10.3390/antibiotics8040230
- França A, Carvalhais V, Vilanova M, Pier GB, Cerca N. Characterization of an *in vitro* fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express.* 2016;6(1):23. DOI: 10.1186/s13568-016-0197-9
- Otto M. Staphylococcal Infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 2013;64:175-88. DOI: 10.1146/annurev-med-042711-140023

23. Hoiby N, Bjarsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:322-32. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
24. Penterman J, Nguyen D, Anderson E, Staudinger BJ, Greenberg EP, Lam JS, Singh PK. Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. *Cell Rep*. 2014;6:293-300. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.12.019
25. Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:1812-17. DOI: 10.1093/jac/dkt086
26. Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, Biavasco F. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:259-61. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03893.x
27. Алшибая ММ, Витович МВ, Николаева ЕН, Царёв ВН. Пародонтопатогенная микрофлора в атеросклеротических бляшках у пациента с сердечно-сосудистым заболеванием. Атеросклероз и дислипидемии. 2019;4(37):64-8. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2019.04.0007
28. Николаева ЕН, Алшибая ММ, Витович МВ. Оценка распространенности инфекционных агентов в атеросклеротических бляшках у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Российская стоматология. 2017;10(1):102-3.
29. Царёв ВН, Николаева ЕН, Витович МВ, Подпорин МС. Биопленкообразующие бактерии в атеросклеротических бляшках у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и хроническим пародонтитом. Клиническая стоматология. 2020;2:38-43. DOI: 10.37988/1811-153X_2020_2_40
30. Snow DE, Everett J, Mayer G, Cox SB, Miller B, Rumbaugh K, Wolcott RA, Wolcott RD. The presence of biofilm structures in atherosclerotic plaques of arteries from legs amputated as a complication of diabetic foot ulcers. *J Wound Care*. 2016;25(2):16-22. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.Sup2.S16
9. Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio*. 2014;5(3):e01206-14. DOI: 10.1128/mBio.01206-14. PMID: 24917599
10. Vitovich MV. Isolation and identification of biofilm-forming microbes in atherosclerotic plaques. *Proceedings of the V National Congress of Bacteriologists*. Moscow: Dynasty, 2019, pp. 22-23. (In Russian).
11. Tsarev VN, Nikolaeva EN, Vitovich MV. Identification of biofilm-forming microbes in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular diseases. *Process Management and Scientific Developments*. Birmingham, UK. 2020;90-7. DOI: 10.34660/INF.2020.4.52976
12. Ippolitov EV, Tsarev VN, Arutyunov SD, Stepanov AG, Podporin MS, Shishova VG, Malazoniya TT. Method for forming of combined periodontal anaerobic bacteria biofilm under fluid conditions *in vitro*. Patent RU No 2619169, effective from 20.11.2015. (In Russian).
13. Didenko LV, Avtandilov GA, Smirnova TA, Shevlagina NV, Tsarev VN, Lebedenko IYu, et al. Study of colonization processes and persistence of microorganisms in artificial materials for medical use. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2015;5:64-9. (In Russian).
14. Ippolitov EV, Didenko LV, Tsarev VN. The characteristics of morphology of biofilm of periodontium under inflammatory diseases of gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, *Candida*-associated periodontitis) according results of electronic microscopy. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika)*. 2015;60(12):59-64. (In Russian).
15. Ramos JN, Souza C, Faria YV, da Silva EC, Veras JFC, Baio PVP, et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):672. DOI: 10.1186/s12879-019-4294-7
16. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:555-67. DOI: 10.1038/nrmicro2182
17. Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov PV. Microbial biofilms in clinical microbiology and antibiotic therapy. Vitebsk, 2017, 300 p. (In Russian).
18. Popp PF, Mascher T. Coordinated Cell Death in Isogenic Bacterial Populations: Sacrificing Some for the Benefit of Many? *J Mol Biol*. 2019;431(23):4656-69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.024
19. Durand PM, Barreto Filho MM, Michod RE. Cell Death in Evolutionary Transitions in Individuality. *Yale J Biol Med*. 2019;92(4):651-62. PMID: 31866780. PMCID: PMC6913816
20. Ikryannikova LN, Kurbatov LK, Soond SM, Zamyatnin AA Jr. Harnessing the Potential of Killers and Altruists within the Microbial Community: A Possible Alternative to Antibiotic Therapy? *Antibiotics*. 2019;8:230. DOI: 10.3390/antibiotics8040230
21. França A, Carvalhais V, Vilanova M, Pier GB, Cerca N. Characterization of an *in vitro* fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express*. 2016;6(1):23. DOI: 10.1186/s13568-016-0197-9
22. Otto M. Staphylococcal Infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med*. 2013;64:175-88. DOI: 10.1146/annurev-med-042711-140023
23. Hoiby N, Bjarsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:322-32. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
24. Penterman J, Nguyen D, Anderson E, Staudinger BJ, Greenberg EP, Lam JS, Singh PK. Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. *Cell Rep*. 2014;6:293-300. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.12.019
25. Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:1812-17. DOI: 10.1093/jac/dkt086
26. Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, Biavasco F. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central

References

1. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, Møller A, Bjarsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65:127-45. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x
2. Ramage G, Robertson SN, Williams C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43:114-20. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.023
3. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*. 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
4. Bjarsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:791-808. DOI: 10.1038/nrd4000
5. Okulich VK, Plotnikov PV, Kabanova AA. Biofilm's role in the pathogenesis of infectious process at the present stage. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2012;4:70-82. (In Russian).
6. Hoiby N, Bjarsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al, for the ESCMID Study Group for Biofilms (ESGB) and Consulting External Expert Werner Zimmerli ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections, 2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:S1-S25. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024
7. Bjarsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sorensen SR, Moser C, Kuhl M, et al. The *in vivo* biofilm. *Trends Microbiol*. 2013 Sep;21(9):466-74. DOI: 10.1016/j.tim.2013.06.002
8. Sharifullina DM, Vasil'eva RM, Yakovleva TI, Nikolaeva EG, Pozdeev OK, Lozhkin AP, Khayrullin RN. Microbial landscape of atherosclerotic plaques biopsy samples. *Kazan Medical Journal*. 2015;96(6):979-82. DOI: 10.17750/KMJ2015-979 (In Russian).

- venous catheters negative on standard microbiological assays. Clin Microbiol Infect. 2012;18:259-61. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03893.x
27. Alshibaya MM, Vitovich MV, Nikolaeva EN, Tsarev VN. Parodontopathogenic microflora in atherosclerotic plaque in patient with cardiovascular disease. The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias. 2019;4(37):64-8. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2019.04.0007 (In Russian).
28. Nikolaeva EN, Alshibaya MM, Vitovich MV. Estimation of the prevalence of infectious agents in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular disease. Russian Stomatology (Rossiiskaya stomatologiya). 2017;10(1):102-3. (In Russian).
29. Tsarev VN, Nikolaeva EN, Vitovich MV, Podporin MS. Biofilm-forming bacteria in atherosclerotic plaques in patients with cardiovascular diseases and chronic periodontitis. Clinical Dentistry. 2020;2:38-43. DOI: 10.37988/1811-153X_2020_2_40 (In Russian).
30. Snow DE, Everett J, Mayer G, Cox SB, Miller B, Rumbaugh K, Wolcott RA, Wolcott RD. The presence of biofilm structures in atherosclerotic plaques of arteries from legs amputated as a complication of diabetic foot ulcers. J Wound Care. 2016;25(2):16-22. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.Sup2.S16

Информация об авторах:

Царёв Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: nikola777@rambler.ru

Витович Марина Вадимовна, аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: vitovich.m.v@gmail.com

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Ипполитов Евгений Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: ippo@bk.ru

Information about authors:

Viktor N. Tsarev, MD, PhD, DSc, head of department by microbiology, virology and immunology professor, director of Research Institute of Medicine and Dentistry, Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: nikola777@rambler.ru

Marina V. Vitovich, postgraduate student of the department of microbiology, virology, immunology, Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: vitovich.m.v@gmail.com

Mikhail S. Podporin, junior researcher of molecular biology research laboratory, Research Institute of Medicine and Dentistry, Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Evgeniy V. Ippolitov, MD, PhD, DSc, professor, senior researcher of molecular biology research laboratory, Research Institute of Medicine and Dentistry, Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700

НОВОСТИ НАУКИ

Четверть бактериальных патогенов может распространять устойчивость к антибиотикам непосредственно среди себе подобных

Биомедицинские инженеры Университета Дьюка продемонстрировали, что по крайней мере 25% устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий способных распространять свою устойчивость непосредственно среди других бактерий. Исследование показывает, что использование антибиотиков не оказывает значительного влияния на скорость, с которой бактерии обмениваются генами, ответственными за устойчивость.

Исследователи использовали новый высокопроизводительный метод измерения скорости, с которой бактерии обмениваются пакетами ДНК, дающими устойчивость. Скорость и способность автоматизировать большую часть процесса могут дать новое понимание того, какие факторы влияют на скорость передачи. Это может помочь врачам замедлить или даже обратить вспять распространение устойчивости у определенных человеческих патогенов.



*One quarter of bacterial pathogens can spread antibiotic resistance directly to peers [Electronic resource].
URL: <https://phys.org/news/2020-01-quarter-bacterial-pathogens-antibiotic-resistance.html>*