

И.В. Чеботарь

Нижегородская государственная медицинская академия, Российская Федерация

Механизмы антибиопленочного иммунитета

Образование микробных биопленок осложняет течение инфекционного процесса. Обзор посвящен проблеме взаимодействия иммунной системы человека с элементами, специфичными для микробных биопленок. Проанализированы иммунные механизмы, которые могут приводить к отторжению биопленок и повреждению биопленочных микробов. Описаны уязвимые места в иммунной обороне макроорганизма от биопленок. Обсуждаются перспективы использования знаний об антибиопленочных реакциях иммунитета в процессах управления биопленочным процессом.

Ключевые слова: микробные биопленки, иммунитет, матрикс.

Введение

Биопленки — это постоянно обновляющееся сообщество микробов, закрепившихся на биогенном или абиогенном субстрате и окруженных полимерным матриксом, который предохраняет их от вредных воздействий и является одним из факторов межклеточного взаимодействия [1]. Инфекции, этиология и патогенез которых связаны с участием микробных биопленок, называют биопленочными. Более 60% всех бактериальных инфекций человека являются биопленочными [2]. Биопленки вносят в течение инфекционного процесса негативные свойства: рецидивирующее течение, склонность к хронизации, резистентность к традиционным антимикробным препаратам [3–5]. Возросший интерес к биопленкам привел к тому, что биопленочные микробы часто воспринимаются как объекты, абсолютно недостижимые для эффекторов иммунной системы. Высказывают постулаты о том, что «микробные биопленки могут блокировать начальные этапы воспаления, приводя к параличу врожденного клеточного иммунитета» [6].

Иммунная система эволюционировала в условиях перманентного противостояния с микробами, организованными в биопленки. Теоретически это должно привести к формированию эффективных противобиопленочных механизмов. Главное доказательство существования подобных механизмов — продолжающееся существование человека как вида. Согласно данным PubMed, в мире ежегодно публикуется более 100 работ, посвященных исследованию взаимодействий биопленочных компонентов с факторами иммунной системы. Такой

массив данных требует проведения регулярных обобщений.

В настоящем обзоре проанализированы механизмы иммунной системы, которые могут приводить к отторжению биопленок и повреждению биопленочных микробов, описаны уязвимые места в иммунной обороне макроорганизма от биопленок, а также рассмотрены перспективы использования знаний об антибиопленочных реакциях иммунитета в процессах управления биопленочным процессом. Следует отметить, что большинство работ по изучению взаимодействия биопленок и иммунной системы было проведено *in vitro* и с использованием всего нескольких актуальных биопленкообразующих видов: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Реже исследовали стрептококки (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*), буркхольдерии (*Burkholderia cepacia*), ксантомонады (*Stenotrophomonas maltophilia*), энтеробактерии (*Escherichia coli*). К сожалению, исследованию иммунных реакций с биопленками, образованными другим микробными видами, посвящены единичные публикации.

Антибиопленочные реакции врожденного иммунитета: фагоцитоз

Фагоциты — нейтрофилы и макрофаги — ключевые фигуры врожденного иммунитета и важнейшие эффекторы в защите человека от бактериальных инфекций [7, 8]. Могут ли фагоциты распознавать биопленочные элементы и обеспечивать элиминацию биопленок?

I.V. Chebotar

Nizhny Novgorod State Medical Academy Russian Federation

Mechanisms of antibiofilm immunity

The formation of microbial biomembranes complicates clinical course of infectious diseases. The review deals with the problem of interaction between immune system and specific components of microbial biofilms. The immune mechanisms which may destroy biomembranes and damage biomembrane-associated microorganisms are analyzed. The vulnerable spots of immune defense against microbial biomembranes are described. This review also issues future prospects of immune-based control of microbial biomembrane processes.

Key words: microbial biomembranes, immunity, matrix.

Анализ литературы дает по этому поводу неоднозначный ответ, который зависит: 1) от видовой принадлежности микроба, формирующего биопленку; 2) степени зрелости биопленки (показано в опытах *in vitro*).

В одной из первых работ было продемонстрировано, что человеческие лейкоциты могут атаковать и проникать в биопленки, образованные *S. aureus* [9]. Несколько позже были доказаны возможности нейтрофилов к глубокой деструкции биопленок *S. aureus*, а также изучены механизмы активации нейтрофилов во время этого процесса: способность нейтрофилов к прямому фагоцитозу биопленочных бактерий, эффективность которого зависела от степени зрелости биопленки (зрелые биопленки отличались более высокой резистентностью к нейтрофилам) [10]. В нашей лаборатории было показано, что нейтрофилы в течение 45-минутного воздействия *in vitro* вызывали практически полное отторжение двухсуточной биопленки *S. aureus*, матрикс которой был организован ДНК-протеиновыми комплексами [11]. В ходе этого взаимодействия большая часть нейтрофилов (80%) погибала к 30-й мин реакции. Мы полагаем, что нейтрофил-зависимая деструкция биопленок была следствием разрушения экстрацеллюлярного матрикса ферментными продуктами фагоцитов, а также прямого фагоцитоза нейтрофилами биопленочных стафилококков. Немецкими коллегами было доказано, что интенсивность адгезии нейтрофилов на биопленках *S. aureus* почти не зависела от IgG- или C₃-опсонизации; при опсонизации увеличивалась лишь интенсивность продукции кислородных радикалов, что усиливало клиренс биопленок [12]. Продукция биоцидных форм кислорода также может рассматриваться в качестве одного из важнейших противобиопленочных механизмов нейтрофилов: сублетальные концентрации перекиси водорода угнетали биопленкообразование *S. epidermidis* за счет репрессии *ica*-оперона, которая приводила к ингибированию транскрипции *ica-ABCD*, а следовательно, к угнетению продукции внеклеточного полисахаридного матрикса [13]. Было подтверждено, что нейтрофилы способны разрушать биопленки *S. aureus*, опсонизированные нормальной сывороткой человека, путем фагоцитоза, сопровождающегося деградацией эластазы и лактоферрина [14]. Эти же авторы наблюдали феномен высвобождения ДНК при гибели нейтрофилов в биопленочном окружении. Это явление могло стать основой для выражения еще одной «постморальной» формы проявления антимикробной активности нейтрофилов, связанной с образованием нейтрофильных экстрацеллюлярных «ловушек» (от англ. *neutrophil extracellular traps*, или NETs) [15]. Регуляция активности нейтрофилов в отношении стафилококковых биопленок *in vivo*, вероятно, контролируется через систему цитокинов: при экспериментальной инфекции у мышей, связанной с артропластикой, ИЛ 1β индуцировал нейтрофил-зависимую элиминацию биопленок *S. aureus* [16].

Приведенные примеры свидетельствуют о том, что нейтрофилы способны бороться со стафилококковыми биопленками. Макрофаги также способны атаковать биопленки *S. aureus*, накапливаясь в них, но их фагоцитарная активность оказалась значительно слабее, чем у нейтрофилов [17].

Более драматичная ситуация складывается с биопленками *P. aeruginosa*. Нейтрофилы человека, добавленные к биопленке *P. aeruginosa*, закреплялись на ее поверхности (хотя и не были способны мигрировать внутрь биопленки, как это происходило с нейтрофилами на биопленках *S. aureus*), фагоцитировали бактерии, секретировали миелопероксидазу, β-глюкуронидазу

и лактоферрин [18]. Реализация респираторного взрыва при этом происходила непродуктивно: 8-кратное повышение потребления кислорода сопровождалось неадекватным (пониженным) выбросом перекиси водорода. Это явление рассматривается в качестве одной из причин неэффективности нейтрофилов в элиминации биопленок синегнойной палочки [18]. Схожие результаты были получены при изучении реактивной хемилюминесценции в системе нейтрофилов человека с биопленками *P. aeruginosa*: интенсивность респираторного взрыва была значительно ниже, чем в случае с планктонными бактериями [19]. Опсонизация биопленочных и планктонных бактерий практически не влияла на относительные показатели хемилюминесценции. После инокуляции нейтрофилов в систему с биопленкой *P. aeruginosa* наблюдалось увеличение числа планктонных бактерий [20]. Вероятно, часть бактерий переходила из биопленочной формы в планктонную, т.е. наблюдалась дисперсия биопленки. Нейтрофилы некротизировались при контакте с биопленками *P. aeruginosa*, и через некоторое время число жизнеспособных бактерий в биопленке увеличивалось, она становилась более выраженной. Некоторые авторы считают, что биопленочные формы синегнойной палочки используют дериваты погибших нейтрофилов в качестве субстрата для своего развития [20].

Компоненты внеклеточного матрикса синегнойной палочки могут распознаваться нейтрофилами и оказывать на них стимулирующий эффект. Например, важный компонент матрикса биопленок *P. aeruginosa* — внеклеточная ДНК — оказывала на нейтрофилы стимулирующий эффект, не зависящий от активации через Toll-подобные рецепторы TLR9 [21]. Инактивация ДНК-матрикса при помощи ДНКазы приводила к ингибированию некоторых проявлений активности нейтрофилов: снижалась секреция цитокинов ИЛ 8 и 1β, способность к фагоцитозу, возможность формировать экстрацеллюлярные трапы. Исследователи полагают, что ДНК-комплексы внеклеточного матрикса являются главными провоспалительными факторами матрикса биопленок *P. aeruginosa* [21]. Другие элементы биопленок *P. aeruginosa* тоже могли оказывать нейтрофил-стимулирующий эффект. Оказалось, что нейтрофилы распознают присутствие представителей важнейшего семейства сигнальных молекул — гомосерин-лактоны, которые регулируют биопленкообразование в рамках кооперации «*quorum sensing*». Молекулы N-(3-оксодеканонил)-L-гомосерин-лактона оказывают на нейтрофилы человека выраженное хемотаксическое действие, усиливают экспрессию CD11b/CD18, CD16, CD64 и индуцируют фагоцитарную активность [22, 23]. В борьбе с биопленками нейтрофилы могут использовать секреторные механизмы. Выше уже было сказано о деградации нейтрофилами лактоферрина в системе с биопленкой *P. aeruginosa*. Известно, что лактоферрин способен подавлять формирование биопленок *P. aeruginosa*, хотя и не может вызывать их отторжение [24]. Представитель еще одной группы антибактериальных субстанций — катионный пептид LL-37, содержащийся в гранулах фагоцитов, — ингибировал формирование биопленок *P. aeruginosa* [25]. Механизм его действия связан с угнетением адгезивности бактерий, стимуляции твичинг-подвижности (от англ. *twitching motility*) и влияния на систему «*quorum sensing*», что в конечном итоге приводило к угнетению биопленкообразования.

Как и в реакциях со стафилококковыми биопленками, поведение фагоцитов *in vivo* при контакте с *P. aeruginosa* тоже регулируется цитокинами. Однако цитокины

не всегда эффективно усиливают антибиопленочные реакции фагоцитов. Макрофаги, индуцированные интерфероном γ , были способны убивать синегнойные бактерии в составе немуюкоидных (безальгинатных) биопленок, но эта способность терялась при контакте с мукоидными (альгинат-продуцирующими) биопленками [26]. Более того, некоторые авторы оценивают роль цитокинов в реакциях с синегнойными биопленками с негативной точки зрения [27]. Присутствие фактора некроза опухолей (ФНО α) и ИЛ 1β усиливало инфильтрацию биопленок нейтрофилами, биоцидная активность которых была направлена против тканей хозяина. При этом отмечалось сохранение биопленочных структур. Авторы расценивают гиперпродукцию цитокинов при пиелонефрите, вызванном *P. aeruginosa*, как основной механизм патогенеза заболевания [27].

Подводя итог обзору работ, посвященных реакциям фагоцитов с биопленками на основе *P. aeruginosa*, можно сказать, что фагоциты способны распознавать и атаковать синегнойные биопленочные структуры. При этом клетки микробов в составе биопленок менее доступны для фагоцитоза, чем планктонные клетки. Свойство большей устойчивости биопленочных бактерий к фагоцитозу претендует на статус закономерности, т.к. прослеживается в реакциях фагоцитов с биопленками разнообразного происхождения. Указанная закономерность экспериментально подтверждена для *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *C. albicans* и многих других видов [28–33].

Главную причину снижения эффективности фагоцитоза биопленочных бактерий связывают с антифагоцитарным влиянием структур внеклеточного матрикса биопленок. Полисахаридный межклеточный адгезин (ПМА, от англ. *polysaccharide intercellular adhesion*, или PIA), организующий матрикс биопленок *S. epidermidis*, снижал активацию фагоцитов, ингибируя фагоцитарный клиренс биопленочных бактерий [28, 30]. Кроме того, ПМА *S. epidermidis* повышал устойчивость стафилококков к человеческим антимикробным пептидам (β -дефенсин, дермацидин, LL-37), а также ингибировал фагоцитарную активность нейтрофилов человека *in vitro* и значительно повышал выживаемость стафилококков в системе с фагоцитами за счет механизмов, не связанных с активностью перекиси водорода [34]. Устойчивость биопленок *S. epidermidis* к макрофагальному фагоцитозу *in vitro* не зависела от микроархитектуры биопленок (степени агрегации клеток, наличия или отсутствия полостей и т.д.), но на нее влиял тип матрикса, а точнее, те структуры, которые преобладали в его составе [35]. Экстрацеллюлярный полисахарид *S. mutans* повышал выживаемость стрептококков в системе с нейтрофилами примерно в 2 раза за счет 2-кратного снижения продукции кислородо-реактивных продуктов нейтрофилов; секреторная деградация при этом не менялась [36]. Альгинат, входящий в состав матрикса биопленок *P. aeruginosa*, блокировал интерферон γ -зависимый киллинг бактерий макрофагами человека [26]. Ранее считалось, что низкая эффективность фагоцитоза в биопленках *P. aeruginosa* объясняется только механическим барьером, который создает внеклеточный матрикс между иммунными эффекторами (фагоциты, антитела, комплемент) и бактериальными клетками [32]. Однако впоследствии выяснилось, что элементы матрикса могут оказывать более изощренное воздействие на фагоциты (нейтрофилы), избирательно подавляя их отдельные функции. Матрикс синегнойных биопленок (даже в отсутствии клеток *P. aeruginosa*) селективно блокировал направленность хемотаксиса нейтрофилов, сохраняя возможность их спонтанной миграции

[37]. Это явление может объяснить вышеупомянутую невозможность нейтрофилов проникать в глубокие слои синегнойной биопленки, а следовательно, их ограниченные возможности в борьбе с синегнойными биопленками [18]. Внеклеточный матрикс биопленок *C. albicans* обеспечивал защиту кандид от нейтрофильного фагоцитоза [33]. Важный фактор биопленочного матрикса актуального периодонтопатогена *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* — поли-N-ацетилглюкозамин — угнетал макрофагальный фагоцитоз [38].

Перечисленные факты позволяют сформулировать еще одну общую закономерность: внеклеточный матрикс биопленок (вне зависимости от таксономической принадлежности микробов, их формирующих) содержит в своем составе структуры, ослабляющие фагоцитарные реакции. Это удивительно, потому что матриксы биопленок имеют принципиальные различия в химическом строении даже внутри одного вида. Например, разные штаммы золотистого стафилококка могут продуцировать полисахаридный матрикс МПА на основе β -1,6-N-ацетилглюкозамина (PNAG), белковый матрикс (семейства Var, Rbf), внеклеточную ДНК [1]. У синегнойной палочки матрикс имеет еще более выраженные структурные отличия по сравнению со стафилококками: он может включать полисахариды (альгинат, Psl, Pel), протеины (CdrA), внеклеточную ДНК [39]. Вероятно, в данном случае мы имеем дело с примером одного из направлений эволюции признака — конвергенции функции у элементов с разными структурными характеристиками. Эта конвергенция происходила (и, возможно, происходит сейчас) под влиянием естественного отбора, роль которого исполнял фагоцитарный киллинг.

Описанные феномены, проявляющиеся в реакциях фагоцитов с биопленками, демонстрируют сложность взаимоотношений, характерных для многих процессов противоинфекционного иммунитета: с одной стороны, фагоциты распознают инфекционный объект (в данном случае биопленку) как «чужое» и пытаются атаковать его, с другой — микробы-возбудители стараются «ускользнуть» от фагоцитоза, используя разнообразные механизмы. Часто процесс «ускользания» не ограничивается маскировкой, а выражается в том, что микробы используют инструменты фагоцитов с целью извлечения собственной «выгоды». Конечно, это касается не только биопленочной инфекционной патологии, но в биопленках можно обнаружить крайне интересные реакции, при помощи которых микробы инверсируют реакции нейтрофилов, укрепляя свою жизнеспособность. Перечислим некоторые из них. Уже была упомянута работа, в которой исследовали постмортальную судьбу нейтрофилов, некротизированных при контакте с биопленкой *P. aeruginosa*. Биопленочные бактерии использовали актин и ДНК погибших нейтрофилов в качестве строительного материала для укрепления собственного внеклеточного матрикса: бактерии активно адгезировались к этим компонентам, выделившимся из погибших нейтрофилов [20]. Аналогичные результаты показаны в работе, где нейтрофилы индуцировали развитие синегнойной биопленки, укрепляя ее матрикс за счет собственных дериватов, F-актина и ДНК, антагонисты которых (полиаспарагиновая кислота и ДНКазы) синергически разрушали раннюю биопленку [40]. Эти данные были подтверждены в опытах по моделированию биопленок *P. aeruginosa* на поверхности контактных линз. В присутствии нейтрофилов рост биопленок шел опережающими темпами. Уже через 24 ч формировалась пленка, которая включала в состав своего матрикса актин

и внеклеточную ДНК, высвободившиеся из нейтрофилов [41]. Оксидативное воздействие со стороны нейтрофилов на *P. aeruginosa* может инициировать весьма интересный механизм защиты бактерий, который запускается возникновением генетических мутаций [42]. Кислородные радикалы вызывают прямую мутацию гена *musA*. Мутация гена *musA*, который кодирует анти- σ -фактор, необходимый для функционирования альгинатного оперона, приводит к дефекту анти- σ -фактора. Альгинатный оперон в ответ на это действие растормаживается, начинается избыточный синтез альгината, который является важнейшим структурным компонентом биопленочного матрикса. В итоге усиливается образование биопленок. Авторы считают, что именно этот механизм реализуется у больных муковисцидозом, приводя к неконтролируемому формированию мукоидных биопленок *P. aeruginosa*. На перитонеальных макрофагах мыши показано, что секретируемые макрофагами продукты не только не угнетают, но усиливают биопленкообразование *P. aeruginosa* и вирулентность биопленочных и планктонных форм *P. aeruginosa*. Исследователи расценивают этот факт как один из важных механизмов патогенеза острого синегнойного пиелонефрита [43, 44].

Таким образом, диалектика взаимоотношений фагоцитов с биопленками демонстрирует сложное разнообразие приемов двустороннего нападения и защиты, результат которых не может быть спрогнозирован.

Антибиопленочные реакции врожденного иммунитета: гуморальные эфффекторы

Современные исследования подтверждают, что комплемент — важнейшая гуморальная система врожденного иммунитета — был способен активироваться биопленками. Очищенный ПМА *S. epidermidis* на модели с цельной кровью полноценно активировал комплемент (компоненты факторов C_1 , C_{3-5}) с образованием мембраноатакующего комплекса, включающего набор факторов C_{5b-9} ; активация сопровождалась высвобождением анафилоксинов (C_{3a} , C_{4a} и C_{5a}) [30]. Исследователи полагают, что активация комплемента протекает по классическому антителозависимому пути. Биопленки золотистого стафилококка обладали такой же активностью: инкубация с нормальной сывороткой приводила к связыванию с биопленкой антител IgG и активации комплемента с отложением на биопленке комплексов C_{3bi} [12]. Биопленочные клетки *P. aeruginosa* также проявляли способность активировать комплемент классическим способом (антителозависимо) и альтернативно, через липополисахарид [45]. Комплемент-активирующая способность биопленочных клеток синегнойной палочки была существенно ниже, чем у планктонных форм. Это было связано с альгинатом, который сам по себе не активирует комплемент, но обладает маскирующим эфффектом, связывая двухвалентные катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , необходимые для эффективной активации комплемента [45]. Аналогичная способность выявлена у важнейшего компонента межклеточного матрикса стафилококковых биопленок PNAG. Его присутствие защищало клетки *S. aureus* от комплемент-зависимого фагоцитоза нейтрофилами [28]. Эта работа подтвердила выдвинутый в 1991 г. постулат о том, что матрикс биопленок создает барьер между антителами, комплементом, фагоцитами и бактериальными клетками [32].

Известны работы, в которых описана патогенетическая роль комплемента при биопленочных инфекциях

[46]. В случае обработки актуального возбудителя биопленочного эндокардита *Aerococcus urinae* комплементом, антителами IgG и фибриногеном наблюдалась резкая агрегация тромбоцитов на поверхности аэрококков. Это приводило к ускоренному формированию биопленки. Сыворотка без комплемента не вызывала агрегации тромбоцитов на поверхности *A. urinae*, тем самым блокировалась первая и очень важная фаза образования биопленки. Авторы считают, что комплемент-зависимое образование биопленок является важным этапом патогенеза эндокардитов, вызванных *A. urinae*.

Другой гуморальный фактор неспецифического иммунитета — лизоцим (мурамидаза) — оказывал на процесс биопленкообразования только усиливающее действие. Изучение нескольких раневых изолятов *S. aureus* показало, что их адгезия к полимерам происходила значительно интенсивнее на поверхности, покрытой лизоцимом [47]. В экспериментах со *S. aureus* показано, что сорбированный на контактных линзах лизоцим усиливал первый этап биопленкообразования стафилококков — адгезию (на поверхности контактных линз) [48]. Кроме того, лизоцим индуцировал агрегацию *S. aureus* — реакцию, являющуюся у стафилококков вторым этапом биопленкообразования [49]. На модели *Lactococcus lactis* было продемонстрировано, что собственные гидролазы, разрушающие пептидогликан, способствуют формированию лактококками биопленок, их дефект нарушает адгезию, а внесение в систему лизоцима извне восстанавливает рост полноценных биопленок [50]. Один из важнейших участников денальных биопленок — *Streptococcus parasanguinis* — экспрессирует на своей поверхности белок VarA1, от которого зависит клеточная адгезия и процесс формирования биопленки. Мурамидазы обеспечивают освобождение т.н. N-терминального мурамидаза-отщепляемого протеиноподобного домена, который опосредует VarA1–VarA1-взаимодействие, приводящее к аутоагрегации стрептококков и формированию биопленки [51]. Почти все немногочисленные работы по изучению влияния лизоцима на бактериальные биопленки свидетельствуют о его способности ускорять биопленочный процесс. Лишь один источник содержит информацию о противобиопленочной активности лизоцима. Речь идет о попытке использовать лизоцим (сшитый с полиэтиленгликольмонометакрилатом) в качестве вещества, защищающего стальную поверхность медицинских устройств от бактериальной адгезии и биопленкообразования. Авторы этого предположения ссылаются на положительные результаты такой обработки в опытах, где лизоцим предотвращал бактериальную адгезию *E. coli* и *S. aureus* [52]. Это противоречие может быть разрешено, когда накопится больше фактической информации о влиянии на биопленки ферментов с мурамидазной активностью.

Антибиопленочные реакции приобретенного (специфического) иммунитета: клеточное звено

При анализе участия T-клеточного звена в антибиопленочном иммунитете обнаруживается много парадоксов и фактов, необъяснимых с позиций классической иммунологии. Эфффекторные реакции T лимфоцитов неизменно ассоциируются с иммунным ответом на инфекционные агенты, сопряженные с внутриклеточным паразитизмом. С этих позиций типичные пиогенные бактерии (например, *S. aureus*) и ассоциированные с ним образования не должны вызывать

Т-клеточный ответ. Однако результаты исследований свидетельствуют о нарушении этого правила. Гистологическое изучение биоптатов из очагов хронического риносинусита, ассоциированных с биопленочным процессом неуточненной этиологии, показало, что в присутствии биопленок наблюдалась более выраженная инфильтрация очага воспаления не только макрофагами, но и Т лимфоцитами [53]. Правда, это явление имело место лишь в том случае, когда биопленка была фиксирована на морфологически нарушенном эпителии. Если же эпителиальная подложка не была разрушена, число Т-клеток в очагах биопленочного и небипленочного воспаления было примерно одинаковым. Подобная картина наблюдалась и при другом типе биопленочных процессов — имплант-ассоциированных инфекциях у больных с эндопротезами [54]. Локальная продукция цитокинов (ИЛ 1 β , 2, 6, 12, 17; ФНО α) при экспериментальной биопленочной инфекции была увеличена [55]. Гиперконцентрация цитокинов в очаге биопленочного воспаления, вызванного *S. aureus*, может объясняться продукцией стафилококками экзотоксинов с суперантигенными свойствами. Этим же можно логично объяснить инфильтрацию очага воспаления Т лимфоцитами (хелперами). Высокая концентрация цитокинов, с одной стороны, является причиной миграции лимфоцитов, с другой — следствием инфильтрации очага воспаления различными популяциями лейкоцитов. Присутствие в биопленочном очаге Т-клеток не означает того, что они выполняют функции, связанные с распознаванием, презентацией антигенных пептидов и атакой (для клеток CD8+) специфических клеток-мишеней, но не исключает, что они могут быть активными участниками патогенеза хронического биопленочного процесса за счет продукции цитокинов. Рассуждая о феномене Т-клеточной инфильтрации биопленочного очага воспаления, мы соглашаемся с предположением, высказанным нашими коллегами, что хроническое биопленочное воспаление приобретает некоторые черты воспаления, вызванного внутриклеточными бактериями [54].

Антибиопленочные реакции приобретенного (специфического) иммунитета: антитела

Возможность гуморального специфического ответа на биопленочные элементы изучалась параллельно с анализом роли биопленок в патологии человека. Исследователи понимали, что должны существовать структуры с антигенными свойствами, которые присутствуют в биопленках, но практически не обнаруживаются у планктонных форм. Антигенность этих структур предполагает возможность развития полноценного антителозависимого иммунного ответа. Эксперименты подтвердили теоретические предположения. Позитивная антибиопленочная роль антител была показана в опытах *in vitro* с биопленками *P. aeruginosa*, в которых сыворотка, содержащая антитела к мукоиду (основой которого является альгинат) и комплемент, обеспечивала опсонин-зависимую активацию фагоцитоза, приводящую к деструкции биопленок [56].

Были предприняты попытки использовать методы серотипирования и серодиагностики для идентификации биопленочного процесса. Еще в середине 90-х гг. прошлого века был идентифицирован антиген ПМА, специфичный для стафилококковых биопленок [57].

Антитела к ПМА были использованы для иммуноэлектронно-микроскопической визуализации матрикса стафилококковых биопленок [58]. Теоретически существование подобных антигенов позволяет разработать простые и воспроизводимые иммунохимические методы обнаружения биопленочного матрикса в материале, полученном от больного. Попытки диагностировать биопленочные инфекции были предприняты при попытке обнаружения специфических антибиопленочных антител в периферической крови. Присутствие анти-Вар-антител в сыворотке крови животных (коров), по мнению ряда авторов, было индикатором хронической биопленочной инфекции, вызванной *S. aureus* [59]. Для идентификации стафилококковых биопленок при катетер-ассоциированных инфекциях был предложен способ, основанный на обнаружении специфических IgG к важному компоненту матрикса стафилококковых биопленок — поли-N-ацетил- β -(1,6)-глюкозамину. Этот способ не оправдал надежд исследователей: хорошие результаты, полученные на животных, не были воспроизведены на человеке [59].

Специалистов не покидали мысли о возможности использования антител и антигенов для профилактики биопленкообразования. Для подтверждения этой теории было проведено большое число исследований *in vitro*. Приведем примеры лишь некоторых из них. Моноклональные антитела к поверхностному адгезину Aap *S. epidermidis*, обеспечивающему фиксацию стафилококков в биопленках, подавляли биопленкообразование [60, 61]. Были получены антитела к коллаген-связывающему фактору (клампинг-фактору) стафилококка, которые блокируют его закрепление на коллагене [62]. Учитывая вовлечение коллагена в биопленкообразование *in vivo*, использование таких антител может быть перспективным для профилактики биопленкообразования в случае имплант-инфекций [63]. Антитела к фимбриям SMF-1 блокировали *in vitro* биопленкообразование *Stenotrophomonas maltophilia* [64]. Поверхностный протеин SesC, отвечающий за адгезию и биопленкообразование *S. epidermidis*, блокировали анти-SesC-антителами, после чего процесс формирования биопленок ингибировался [65]. Последний эксперимент стал основой для создания SesC-вакцины, испытания которой на крысах дали положительный эффект в плане профилактики биопленкообразования *S. epidermidis* [65].

Перечисленные факты дают представление только о частных реакциях иммунных эффекторов с тем или иным компонентом различных биопленок. Более того, значительная часть наблюдений была проведена *in vitro*, т.е. в условиях, далеких от реального очага инфекционного воспаления. О роли некоторых иммунных эффекторов (тучные клетки, белки острой фазы и пр.) в противобиопленочном иммунитете не имеется вообще никакой информации. Следует помнить, что комплексный ответ иммунной системы не является суммой отдельных эффектов. Например, полноценная антитело- и комплемент-зависимая опсонизация очищенного ПМА *S. epidermidis* в эксперименте *in vitro* не обеспечивала полноценного фагоцитоза биопленки на основе того же стафилококка, а даже наоборот: фагоцитоз опсонизированной биопленки был редуцирован [30]. Таких примеров можно привести множество на каждом из уровней иммунного реагирования. Все это говорит о том, что полученные к настоящему времени результаты не могут помочь составить общую картину о генеральных реакциях иммунной системы, специфически возника-

ющих при биопленочных инфекциях. Конечно, попытки поиска общих иммунологических изменений (иммунограмма крови, цитокиновый профиль сыворотки), специфически возникающих при биопленочном процессе, были предприняты, но они не увенчались открытием каких-либо глобальных закономерностей.

Заключение

Проведенный анализ сложных взаимодействий в системе «биопленка—иммунитет» позволяет сделать следующие выводы.

- Все основные виды иммунитета (врожденный и приобретенный, клеточный и гуморальный) обладают эффекторными механизмами, направленными на элиминацию биопленок.
- Реакции иммунной системы могут оказаться неэффективными в борьбе с биопленками. Более того, в некоторых случаях биопленочные микробы могут извлекать пользу из контакта с иммунными эффекторами, что приводит к усиленному биопленкообразованию. Причиной этого может быть отстаю-

щая адаптация иммунного ответа на биопленочный инфекционный процесс.

- Наблюдается «перекос» между исследованием реакций иммунной системы на биопленки *in vitro* и *in vivo*: работы по изучению биопленок в живом организме в режиме «real-time» очень важны, информативны, но крайне малочисленны. В связи с этим данное направление является крайне перспективным для современной медицинской науки.
- Перспективные направления исследований связаны с практическим использованием знаний о взаимодействиях антител с биопленочными антигенами и разработкой на этой основе новых методов диагностики и профилактики биопленочных инфекций.
- Исследование взаимоотношений биопленочных сообществ с иммунной системой претендуют на то, чтобы стать самостоятельным разделом иммунологической науки, посвященным антибиопленочному иммунитету. Под термином «антибиопленочный иммунитет» мы предлагаем понимать совокупность защитных реакций иммунной системы, наблюдающихся при контакте с элементами, встречающимися исключительно в микробных биопленках.

REFERENCES

1. Mayanskii A.N., Chebotar' I.V. Stafilokokkovye bioplenki: struktura, regulyatsiya, ottorzhenie. *Zhurn. mikrobiol.* 2011; 1: 101–108.
2. L'yuis K. Persistiruyushchie kletki i zagadka vyzhivaniya bioplenok. *Biokhimiya.* 2005; 70 (2): 327–336.
3. Bekhalo V.A., Bondarenko V.M., Sysolyatina E.V., Nagurskaya E.V. Immunobiologicheskie osobennosti bakterial'nykh kletok meditsinskikh bioplenok. *Zhurn. mikrobiol.* 2010; 4: 97–105.
4. Chebotar' I.V., Mayanskii A.N., Konchakova E.D. i dr. Antibiotikorezistentnost' bioplenochnykh bakterii. *Klin. mikrobiol. i antimikrobn. khimioter.* 2012; 14 (1): 51–58.
5. Costerton J. W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318–1322.
6. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Exp. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2008; 6 (2): 201–208.
7. Pinegin B.V., Mayanskii A.N. Neitrofilny: struktura i funktsiya. *Immunologiya.* 2007; 6: 374–382.
8. Verschoor C.P., Puchta A., Bowdish D.M. The macrophage. *Meth. Mol. Biol.* 2012; 844: 139–156.
9. Leid J.G., Shirliff M.E., Costerton J.W., Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect. Immun.* 2002; 70: 6339–6345.
10. Gunther F., Wabnitz G.H., Stroh P. et al. Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol. Immunol.* 2009; 46 (8–9): 1805–1813.
11. Chebotar' I.V., Konchakova E.D., Evteeva N.I. Neitrofilzavisimoe razrushenie bioplenok, obrazovannykh *Staphylococcus aureus*. *Zhurn. mikrobiol.* 2012; 1: 10–15.
12. Stroh P., Gunther F., Meyle E. et al. Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms by polymorphonuclear neutrophils: oxygen radical production but not phagocytosis depends on opsonisation with immunoglobulin G. *Immunobiology.* 2011; 216 (3): 351–357.
13. Glynn A.A., O'Donnell S.T., Molony D.C. et al. Hydrogen peroxide induced repression of icaADBC transcription and biofilm development in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Orthop. Res.* 2009; 27 (5): 627–630.
14. Meyle E., Stroh P., Gunther F. et al. Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int. J. Artif. Organs.* 2010; 33 (9): 608–620.
15. Dolgushin I.L., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. Neitrofil'nye vnekletochnye lovushki i metody otsenki funktsional'nogo statusa neutrofilov. *M.: Izd-vo RAMN.* 2009. 208 s.
16. Bernthal N.M., Pribaz J.R., Stavakis A.I. et al. Protective role of IL-1 β against post-arthroplasty *Staphylococcus aureus* infection. *J. Orthop. Res.* 2011; 29 (10): 1621–1626.
17. Thurlow L.R., Hanke M.L., Fritz T. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J. Immunol.* 2011; 186 (11): 6585–6596.
18. Jesaitis A.J., Franklin M.J., Berglund D. et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J. Immunol.* 2003; 171 (8): 4329–4339.
19. Jensen E.T., Kharazmi A., Lam K., Costerton J.W., Hoiby N. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect. Immun.* 1990; 58 (7): 2383–2385.
20. Walker T.S., Tomlin K.L., Worthen G.S. et al. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2005; 73 (6): 3693–3701.
21. Fuxman Bass J.I., Russo D.M., Gabelloni M.L. et al. Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Immunol.* 2010; 184 (11): 6386–6395.
22. Zimmermann S., Wagner C., Muller W. et al. Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.* 2006; 74 (10): 5687–5692.
23. Wagner C., Zimmermann S., Brenner-Weiss G. et al. The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387 (2): 481–487.
24. Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 2002; 417: 552–555.

25. Overhage J., Campisano A., Bains M. et al. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect. Immun.* 2008; 76 (9): 4176–4182.
26. Leid J.G., Willson C.J., Shirtliff M.E. et al. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J. Immunol.* 2005; 175 (11): 7512–7518.
27. Mittal R., Sharma S., Chhibber S., Harjai K. Evaluation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in an experimental pyelonephritis model induced with planktonic and biofilms cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2009; 20 (3):35–42.
28. Kropec A., Maira-Litran T., Jefferson K.K. et al. Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Infect. Immun.* 2005; 73 (10): 6868–6876.
29. Cerca N., Jefferson K.K., Oliveira R. et al. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect. Immun.* 2006; 74 (8): 4849–4855.
30. Fredheim E.G., Granslo H.N., Flaegstad T. et al. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011; 63 (2): 269–280.
31. Steinberg D., Poran S., Shapira L. The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils. *Arch. Oral. Biol.* 1999; 44 (5): 437–444.
32. Kharazmi A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol. Lett.* 1991; 30 (2): 201–205.
33. Katragkou A., Kruhlak M.J., Simitopoulou M. et al. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J. Infect. Dis.* 2010; 201 (12): 1941–1949.
34. Vuong C., Voyich J.M., Fischer E.R. et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 2004; 6 (3): 269–275.
35. Schommer N.N., Christner M., Hentschke M. et al. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect. Immun.* 2011; 79 (6): 2267–2276.
36. Steinberg D., Poran S., Shapira L. The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils. *Arch. Oral. Biol.* 1999; 44 (5): 437–444.
37. Hansch G.M., Brenner-Weiss G., Prior B. et al. The extracellular polymer substance of *Pseudomonas aeruginosa*: too slippery for neutrophils to migrate on? *Int. J. Artif. Organs.* 2008; 31 (9): 796–803.
38. Venketaraman V., Lin A.K., Le A. et al. Both leukotoxin and poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide protect *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cells from macrophage killing. *Microb. Pathog.* 2008; 45 (3): 173–180.
39. Mayanskii A.N., Chebotar' I.V., Rudneva E.I., Chistyakova V.P. *Pseudomonas aeruginosa*: karakteristika bioplenochnogo protsessa. *Mol. gen., mikrobiol. i virusol.* 2012; 1: 3–8.
40. Parks Q.M., Young R.L., Poch K.R. et al. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human F-actin and DNA as targets for therapy. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58 (4): 492–502.
41. Robertson D.M., Parks Q.M., Young R.L. et al. Disruption of contact lens-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed in the presence of neutrophils. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52 (5): 2844–2850.
42. Mathee K., Ciofu O., Sternberg C. et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology.* 1999; 145 (6): 1349–1357.
43. Mittal R., Sharma S., Chhibber S., Harjai K. Effect of macrophage secretory products on elaboration of virulence factors by planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 29 (1): 12–26.
44. Mittal R., Aggarwal S., Sharma S. et al. Contribution of macrophage secretory products to urovirulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2009; 57 (2): 156–164.
45. Jensen E.T., Kharazmi A., Garred P. et al. Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb. Pathog.* 1993; 15 (5): 377–388.
46. Shannon O., Morgelin M., Rasmussen M. Platelet activation and biofilm formation by *Aerococcus urinae*, an endocarditis-causing pathogen. *Infect. Immun.* 2010; 78 (10): 4268–4275.
47. Elgalai I., Foster H.A. Comparison of adhesion of wound isolates of *Staphylococcus aureus* to immobilized proteins. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 94 (3): 413–442.
48. Thakur A., Chauhan A., Willcox M.D. Effect of lysozyme on adhesion and toxin release by *Staphylococcus aureus*. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 1999; 27 (3–4): 224–227.
49. Millar M.R., Inglis T. Influence of lysozyme on aggregation of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25 (9): 1587–1590.
50. Mercier C., Durrieu C., Briandet R. et al. Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2002; 46 (1): 235–243.
51. Liang X., Chen Y.Y., Ruiz T., Wu H. New cell surface protein involved in biofilm formation by *Streptococcus parasanguinis*. *Infect. Immun.* 2011; 79 (8): 3239–3248.
52. Yuan S., Wan D., Liang B. et al. Lysozyme-coupled poly(poly(ethylene glycol) methacrylate)-stainless steel hybrids and their antifouling and antibacterial surfaces. *Langmuir.* 2011; 27 (6): 2761–2774.
53. Wood A.J., Fraser J., Swi S., Amirapu S., Douglas R.G. Are biofilms associated with an inflammatory response in chronic rhinosinusitis? *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2011; 1: 335–339.
54. Kotsougiani D., Pioch M., Prior B. et al. Activation of T lymphocytes in response to persistent bacterial infection: induction of CD11b and of Toll-Like receptors on T cells. *Int. J. Inflamm.* 2010; 10: 526740.
55. Prabhakara R., Harro J.M., Leid J.G. et al. Murine immune response to a chronic *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect. Immun.* 2011; 79 (4): 1789–1796.
56. Meluleni G.J., Grout M., Evans D.J., Pier G.B. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm *in vitro* are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J. Immunol.* 1995; 155 (4): 2029–2203.
57. Mack D., Fischer W., Krokotsch A. et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 1996; 178 (1): 175–183.
58. McKenney D., Hubner J., Muller E. et al. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.* 1998; 66 (10): 4711–4720.
59. Cucarella C., Tormo M.A., Ubeda C. et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2004; 72 (4): 2177–2185.
60. Sadovskaya I., Faure S., Watier D. et al. Potential use of poly-N-acetyl-beta-(1,6)-glucosamine as an antigen for diagnosis of staphylococcal orthopedic-prosthesis-related infections. *Clin. Vacc. Immunol.* 2007; 14 (12): 1609–1615.
61. Sun D., Accavitti M.A., Bryers J.D. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12 (1): 93–100.
62. Visai L., Xu Y., Casolini F. et al. Monoclonal antibodies to CNA, a collagen-binding microbial surface component recogniz-

- ing adhesive matrix molecules, detach *Staphylococcus aureus* from a collagen substrate. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (51): 39837–43985.
63. Arciola C.R., Balaban N., Baldassarri L. et al. Combating implant infections. Remarks by a women's team. *Int. J. Artif. Organs.* 2008; 31 (9): 858–864.
64. de Oliveira-Garcia D., Dall'Agnol M., Rosales M. et al. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol.* 2003; 5 (9): 625–636.
65. Shahrooei M., Hira V., Khodaparast L. et al. Vaccination with SesC decreases *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Infect. Immun.* 2012; 80 (10): 3660–3668.

FOR CORRESPONDENCE

Chebotar Igor Vladimirovich, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Chair of Microbiology and Immunology, State Education Institute Nizhniy Novgorod State Medical Academy, Ministry of Health, Russian Federation
Address: 603005, Nizhniy Novgorod, Minin and Pozharskiy square, 10/1; **Tel.:** (831) 439-09-43; **E-mail:** rector@gma.nnov.ru