

**Изучение действия кларитромицина и эритромициновых антибиотиков на биопленку
*Pseudomonas aeruginosa***

А.Ю. Христинченко, Д.Т. Джандарова, С.А. Румянцев

Московский физико-технический институт (государственный университет)

Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
им. Д. Рогачева

Биопленки – особая и, тем не менее, преобладающая форма существования микроорганизмов. Бактерии, существующие в форме биопленки, обладают повышенной устойчивостью к антибиотикам за счет наличия таких механизмов защиты, как экзополимерный матрикс, обмен плазмидами резистентности, наличие клеток-персистеров и т.д. [1] Проблема борьбы с биопленками стоит остро в клиниках всего мира. Повышенную устойчивость к антибактериальным агентам биопленка проявляет за счет защитной функции экзополимерного матрикса, который способен ограничивать диффузию больших молекул антибактериальных веществ к клеткам, а так же связывать антимикробные препараты. Отрицательно заряженные экзополисахариды эффективно защищают клетки от гидрофильных и положительно заряженных антибиотиков. Еще одна причина повышенной устойчивости – способность клеток биопленки обмениваться плазмидами резистентности, плазмидами, которые несут в себе гены ответственные за резистентность клеток к тем или иным антибиотикам. В связи с этим в настоящее время разработка методов борьбы с биопленками ведется в нескольких направлениях:

- Предотвращение первичного инфицирования.
- Минимизация адгезии микробных клеток.
- Разработка методов проникновения через матрикс биопленки различных биоцидов.
- Блокировка синтеза, разрушение матрикса.
- Нарушение межклеточного обмена информацией.

Данная работа посвящена изучению такого способа противостояния биопленкам, как фармацевтическое увеличение проницаемости экзополимерного матрикса. В нашем исследовании мы изучали эффект, оказываемый антибиотиком кларитромицином (Clarithromycin) на биопленки, образуемые синегнойной палочкой (бактерией *Pseudomonas aeruginosa*). Синегнойная палочка – грамотрицательная, подвижная, палочковидная бактерия, является условным патогеном для человека, так как не представляет опасности для людей с хорошим иммунитетом. Однако для людей с ослабленным иммунитетом крайне опасна, является возбудителем таких инфекционных заболеваний как менингиты, уретиты, хронические тонзиллиты, фарингиты, риниты,

синуситы, бронхиты. И это далеко не полный список заболеваний. Обладает крайней устойчивостью к антибиотикам, в связи с наличием таких механизмов защиты как – О и Н антигены, ферменты агрессии (к примеру фосфолипаза, эластаза, плазмокоагулаза), факторы адгезии – пили и внеклеточная слизь, образование биопленок. [2]

Было сделано предположение, что антибиотик кларитромицин (Clarithromycin) способен ингибировать выработку матрикса бактериями биопленки, тем самым давая возможность другим антибиотикам непосредственно воздействовать на бактерии синегнойной палочки. Для доказательства этого предположения была проведена серия экспериментов.

В первом эксперименте было визуально показано ингибирующее действие кларитромицина на выработку экзополимерного матрикса. Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* были засеяны в пробирки с LB бульоном, с добавлением кларитромицина в некоторые из них. После инкубирования в пробирках с кларитромицином визуально биопленка или не наблюдалась вообще или была намного тоньше, чем в пробирках с теми же культурами, но без кларитромицина. Тем не менее, сделав пересев на кровяной агар, мы выявили в них планктонный рост культур, сделав из этого вывод, что кларитромицин способен ингибировать выработку матрикса биопленки синегнойной палочки, но не способен подавить рост культуры, так как данные штаммы бактерий резистентны к нему.

В качестве антибиотика-киллера, роль которого заключалась в уничтожении бактерий после проникновения через матрикс, истонченный при помощи кларитромицина, был выбран амикацин. Из 20 штаммов, участвовавших в эксперименте, 12 были к нему чувствительны и 8 резистентны. Культуру, чувствительную к амикацину мы засеивали в 4 пробирки: без добавления антибиотиков, с совместным и отдельным добавлением кларитромицина и амикацина. Этим опытом мы показали, что амикацин не способен самостоятельно проникнуть через матрикс (наблюдалось характерное образование биопленки), кларитромицин не способен ингибировать планктонный рост бактерий, а одновременное сочетание этих двух антибиотиков способно уничтожить биопленку.

В последующих экспериментах предположение о способности кларитромицина ингибировать выработку матрикса, давая возможность амикацину достигать и уничтожать бактерии, было так же подтверждено спектрофотометрическим методом. Было выявлено, что наименьшей оптической плотностью обладает бульон с культурами, амикацином и кларитромицином. Подтвердить это мы так же смогли снимая показания оптической плотности в течении 18 часов на анализаторе фирмы Thermo Scientific Multiscan Ascent и построив кривые роста для культур отдельно и для культур с антибиотиками.

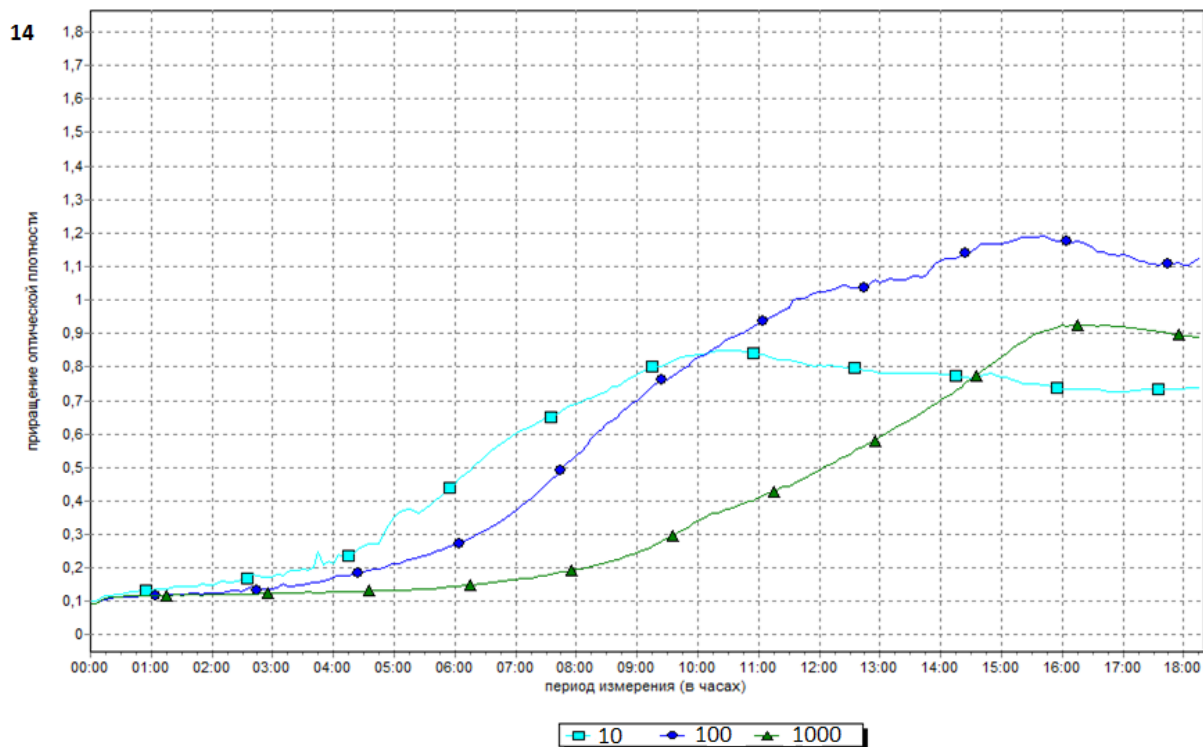


График 1. Кривые роста для культуры (в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000) без добавления кларитромицина и амикацина.

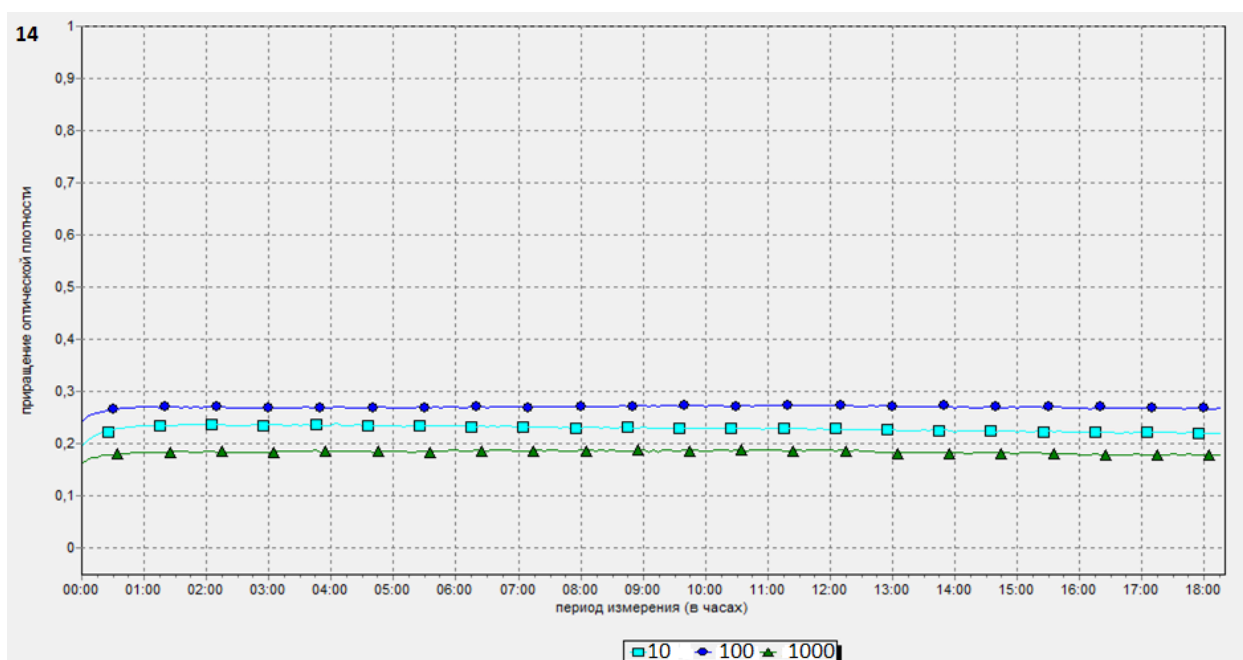


График 2. Кривые роста для культуры (в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000) с добавлением кларитромицина и амикацина.

Таким образом в данной работе несколькими способами доказано ингибирующее действие кларитромицина на выработку экзополимерного матрикса бактериями биопленки, а так же показано, что сочетание кларитромицина и антибиотика, к которому данный штамм бактерий чувствителен, способно эффективно уничтожить биопленку.

Кроме того, в ходе нашего исследования было введено понятие «степень пленкообразования штаммов», которое определяет насколько тот или иной штамм бактерий склонен к образованию биопленок. Определение данного показателя может быть крайне важно в клинической практике. В данной работе дано подробное описание методики его определения.

Литература

1. 1. *Flemming H.C, Wingender J.* The biofilm matrix, *Nature Reviews Microbiology* 8, 623–633 (1 September 2010) | doi:10.1038/nrmicro2415
2. *Aldona L. Baltch and Raymond P. Smith.* *Pseudomonas aeruginosa: Infections and treatment* (*Infectious Disease and Therapy. Vol. 12.*) Edited by 615 pp. New York, Marcel Dekker, 1994

Сведения об авторах

Христинченко А.Ю. – студентка второго года магистратуры ФБМФ МФТИ.

Джандарова Д.Т. – заведующая лаборатории микробиологии ДГОИ ФНКЦ

Румянцев С.А. - заместитель генерального директора по научной и учебной работе ФНКЦ ДГОИ, директор Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины (ВШМЭМ), доктор медицинских наук, профессор.