

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 2(24)

2020 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований по медицинской и биологической отраслям науки (31.12.2009, протокол 25/1)

Журнал зарегистрирован
Министерством информации
Республики Беларусь,
Свид. № 762 от 6.11.2009

Подписано в печать 30.09.20
Формат 60×90/8. Бумага мелованная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 150 экз.
Усл. печ. л. 16,25. Уч.-изд. л. 9,56.
Зак. 250.

Издатель ГУ «Республиканский
научно-практический центр
радиационной медицины и
экологии человека»
Свидетельство N 1/410 от 14.08.2014

Отпечатано в КУП
«Редакция газеты
«Гомельская праўда»
г. Гомель, ул. Полесская, 17а

ISSN 2074-2088

Главный редактор, председатель редакционной коллегии

А.В. Рожко (д.м.н., доцент)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., профессор, зам. гл. редактора), В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), Н.Г. Власова (д.б.н., профессор, научный редактор), А.В. Величко (к.м.н., доцент), И.В. Веялкин (к.б.н., доцент), А.В. Воропаева (к.м.н., доцент), Д.И. Гавриленко (к.м.н.), В.В. Евсеенко (к.п.с.н.), С.В. Зыблева (к.м.н., отв. секретарь), А.В. Жарикова (к.м.н.), С.А. Игумнов (д.м.н., профессор), И.Н. Коляда (к.м.н.), А.В. Коротаев (к.м.н., доцент), А.Н. Лызилов (д.м.н., профессор), А.В. Макарич (к.м.н., доцент), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), Я.Л. Навменова (к.м.н., доцент), Э.А. Надыров (к.м.н., доцент), И.А. Новикова (д.м.н., профессор), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), Э.А. Повелица (к.м.н.), А.С. Подгорная (к.м.н.), Ю.И. Рожко (к.м.н., доцент), И.П. Ромашевская (к.м.н.), М.Г. Русаленко (к.м.н., доцент), А.П. Саливончик (к.б.н.), А.Е. Силин (к.б.н., доцент), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), А.Н. Цуканов (к.м.н.), Н.И. Шевченко (к.б.н., доцент), Ю.И. Ярец (к.м.н., доцент)

Редакционный совет

Е.Л. Богдан (МЗ РБ, Минск), А.В. Аклеев (д.м.н., профессор, Челябинск), О.В. Алейникова (д.м.н., чл.-кор. НАН РБ, Минск), С.С. Алексанин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Д.А. Базыка (д.м.н., профессор, Киев), А.П. Бирюков (д.м.н., профессор, Москва), Л.А. Бокерия (д.м.н., академик РАН и РАМН, Москва), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), В.И. Жарко (Минск), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Г. Кручинский (д.м.н., Пинск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), Д.Л. Пиневиц (МЗ РБ, Минск), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Д. Тронько (д.м.н., профессор, Киев), А.Л. Усс (д.м.н., профессор, Минск), В.А. Филонюк (к.м.н., доцент, Минск), Р.А. Часнойть (к.э.н., Минск), В.Е. Шевчук (к.м.н., Минск), В.Д. Шило (Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции 246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.mbp.rcrm.by> e-mail: mbp@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека», 2020

№ 2(24)

2020

Medical and Biological Problems of Life Activity

Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

ISSN 2074-2088

Обзоры и проблемные статьи

- А.В. Жарикова, Н.В. Лысенкова**
Пути повышения эффективности ведения пациентов с головными болями 5
- С.В. Зыблева, С.Л. Зыблев**
Иммунологические механизмы эффекторного звена системы иммунитета при аллотрансплантации 13
- М.Г. Русаленко, И.Г. Савастеева, С.В. Панкова, В.В. Сукристый**
Пищевое поведение и метаболические нарушения: что первостепенно 25

Медико-биологические проблемы

- Н.Г. Власова**
Концепция репрезентативного лица в системе радиационной защиты: от рекомендаций МКРЗ к практическому применению 33
- С.И. Сычик**
Оценка ингаляционных доз облучения населения и пожарных при лесных пожарах в зоне отчуждения, загрязненной в результате катастрофы на ЧАЭС 40
- В.В. Татчихин**
Факторы риска возникновения рака на слизистой оболочке полости рта 52
- Н.И. Тимохина, Н.Н. Веялкин, Э.А. Надыров, Ю.В. Дворник, Е.В. Цуканова, К.М. Фабушева**
Влияние однократного облучения на образование опухолей в легких мышей линии Af 59
- Д.А. Чечетин**
Адаптивное физическое воспитание детей с нарушением костно-мышечного взаимоотношения позвоночного столба 65

Клиническая медицина

- Ю.А. Волчек, Н.В. Карлович, Е.Г. Сазонова, Т.В. Мохорт**
Оценка распространенности гиперпролактинемии и параметров, ассоциированных с изменением уровня пролактина при хронической болезни почек 72

Reviews and problem articles

- A.V. Zharikova, N.V. Lysenkova**
Ways to increase efficiency of managing patients with headaches 5
- S. Zybleva, S. Zyblev**
The immunologic mechanism of the immune system effector am in the allotransplantation 13
- M.G. Rusalenko, I.G. Savasteeva, S.V. Pankova, V.V. Sukristy**
Dietary behavior and metabolic disorders: what is first 25

Medical-biological problems

- N. Vlasova**
The concept of a representative person in the radiation protection system: from the ICRP recommendations to practical application 33
- S.I. Sychik**
Inhalation dose assessment for public and firefighters in case of forest fires in the exclusion zone contaminated after the Chernobyl catastrophe 40
- V.V. Tatchihin**
Risk factors for oral cavity cancer 52
- N.I. Tsimokhina, N.N. Veyalkina, E.A. Nadyrov, Y.V. Dvornik, E.V. Tsukanova, K.M. Fabusheva**
Effect of single irradiation on the formation of tumors in the lungs of Af mouse 59
- D.A. Chechetin**
Adaptive physical education of children with disorders of the musculoskeletal relationship of the spine 65

Clinical medicine

- Y.A. Volchek, N.V. Karlovich, A.G. Sazonova, T.V. Mokhort**
The assessment of the prevalence of hyperprolactinemia and parameters associated with changes in the level of prolactin in chronic kidney disease 72

- А.Ю. Захарко, Н.П. Митьковская, Т.В. Статкевич, А.С. Подгорная, О.В. Мурашко**
Гипертензивные расстройства беременности и сердечно-сосудистые риски 82
- А.Yu. Zaharko, N.P. Mitkovskaya, T.V. Statkevich, A.S. Podgornaya, O.V. Murashko**
Hypertensive disorders in pregnant women and cardiovascular risks
- С.В. Зыблева, А.Е. Силин, О.А. Сердюкова, Е.С. Тихонова**
Клинико-иммунологические и генетические особенности пациентов с атопическим дерматитом 89
- S.V. Zybleva, A.E. Silin, O.A. Serdyukova, E.S. Tihonova**
Clinical, immunological and genetic characteristics in patients with atopic dermatitis
- Ж.М. Козич, В.Н. Мартинков, Ж.Н. Пугачева, М.Ю. Жандаров, Л.А. Смирнова**
Роль экспрессии CD95, CD56 и иммуногистохимического маркера CD138 в опухолевой прогрессии у пациентов с моноклональной гаммапатией неопределённого значения и солитарной плазмацитомой у жителей гомельского региона Беларуси 96
- Z.M. Kozich, V.N. Martinkov, Z.N. Pugacheva, M.Y. Zhandarov, L.A. Smirnova**
The role of CD95, CD56 expression, immunohistochemical marker CD138 in tumor progression in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and solitary plasmacytoma in residents of the Gomel region, Belarus
- А.В. Коротаев, А.М. Пристром, Е.П. Науменко, Л.Е. Коротаева, С.Н. Кадол**
Биомаркеры фиброза и воспаления и их связь с патологическим ремоделированием миокарда левого желудочка 102
- A.V. Korotaev, A.M. Pristrom, E.P. Naumenko, L.E. Korotaeva, S.N. Kadol**
Biomarkers of fibrosis and inflammation and their relationship to pathological remodeling of the left ventricular myocardium
- А.А. Маркова, Н.Ю. Горбунова, Н.А. Поздеева**
Сравнительный анализ отдалённых результатов лечения пациентов с закрытоугольной глаукомой с плоской радужкой 110
- A.A. Markova, N.Y. Gorbunova, N.A. Pozdeyeva**
Comparative analysis of long-term results of treatment of patients with angle-closure glaucoma with plateau iris
- Ю.И. Ярец**
Матрикс бактериальной биопленки: цитотоксичность, влияние на пролиферативную активность и степень экспрессии поверхностных маркеров фибробластов 116
- Y. Yarets**
Bacterial biofilm matrix: cytotoxicity, effects on proliferative activity and the degree of expression of fibroblast surface markers

Обмен опытом**Experience exchange**

- К.Н. Бuzдалкин, Н.Г. Власова**
Проблемы оценки доз аварийного облучения оперативного персонала АЭС 125
- K.N. Buzdalkin, N.G. Vlasova**
Problems of emergency radiation doses estimation

МАТРИКС БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКИ: ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ, ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И СТЕПЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ ФИБРОБЛАСТОВ

ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Беларусь

Проанализировано влияние матрикса биопленки грамположительных (Г+) и грамотрицательных (Г-) бактерий на состояние культуры фибробластов здоровой кожи при проведении совместного культивирования *in vitro*. Сравнительный анализ показал, что в наибольшей степени пролиферативную активность фибробластов угнетал матрикс биопленки Г- бактерий, преимущественно *P. aeruginosa*. Компоненты матрикса *P. aeruginosa* оказывали наиболее выраженное воздействие на адгезию клеток, на их способность распластываться и формировать монослой, а также характеризовались наиболее высокой цитотоксичностью по результатам ЛДГ-теста. Показатели пролиферативной активности фибробластов, полученные при культивировании с матриксом *K. pneumoniae* и *S. aureus*, были практически идентичны, для *E. faecalis* выявлено наименьшее влияние на пролиферативную активность. Воздействие компонентов биопленки Г+ и Г- приводило к снижению экспрессии иммунофенотипических маркеров фибробластов – CD 10, CD 44, CD73, CD 90, степень их потери была различной в зависимости от вида бактерий. Биопленка Г- бактерий в большей степени, чем Г+ бактерий, способствовала развитию апоптоза (по CD 95) и гибели (по 7-AAD) фибробластов.

Ключевые слова: бактериальная биопленка, матрикс биопленки, фибробласты, проточная цитофлуориметрия, цитотоксичность, пролиферативная активность

Введение

Бактериальные биопленки состоят из ряда структур, в число которых входят клетки и окружающий их внеклеточный матрикс. Матрикс биопленок играют важную роль в защите бактерий от внешних воздействий; обеспечивает ускользание патогена от иммунной системы, способствуя его выживанию и персистенции. Биопленочный матрикс является биохимически активной системой, представляющей собой «резервуар ферментов», которые используются бактериями для адгезии/колонизации, инвазии и агрессии. Известно, что компоненты матрикса *P. aeruginosa* (щелочная протеаза, аминоклепептидаза, эластаза, белки наружной мембраны) вызывают фиксацию *P. aeruginosa* на культуральных клетках. В составе матрикса биопленок *S. aureus* были обнаружены известные факторы агрессии: лейкоцидин, нуклеаза, сериновая протеаза, дериваты гемоглибина. Ферменты инвазии попадают во вне-

клеточное пространство в результате активной секреции либо после гибели и распада микробных клеток. Высвобождаясь во внутреннее пространство биопленки, они адсорбируются структурами матрикса, создавая тем самым инвазивный потенциал биопленки, роль которого еще не до конца изучена. Это открывает новое перспективное поле в исследовательской деятельности патогенеза инфекционного процесса [1, 2].

Фибробласты – клетки функционально ведущего гистогенетического ряда соединительной ткани – представляют собой объект многочисленных научных исследований. Экспериментальные и клинические исследования посвящены использованию культур фибробластов для ликвидации дефектов кожных покровов, полученных вследствие ожогов, травм, трофических нарушений как самостоятельно, так и в сочетании с другими клетками, в том числе и в виде коммерческих препаратов [3].

Известно, что в основе нарушения процессов репарации дермы, формирования длительно-незаживающего раневого дефекта лежат фундаментальные изменения, ассоциированные с фибробластами, – их количеством, морфологией, пролиферативным потенциалом, функциональной активностью. Фибробласты в норме контролируют состав и структуру межклеточного матрикса; секретируют различные биологические вещества, регулирующие пролиферацию, миграцию, дифференцировку, функциональную активность, хоуминг клеток различных дифферонов в тканях по механизмам паракринного взаимодействия. Немаловажную роль фибробласты дермы играют в регуляции иммунного ответа в качестве «сторожевых» клеток, организующих ответы соединительной ткани на инфекцию или повреждение. Нарушение физиологического баланса в клеточной популяции фибробластов приводит к значительным изменениям нормального процесса репаративной регенерации [4].

Цель исследования: провести сравнительный анализ результатов оценки состояния фибробластов после воздействия матрикса биопленки грамположительных (Г+) и грамотрицательных (Г-) бактерий.

Материал и методы исследования

Исследование выполнялось в рамках НИР БРФФИ «Жизнеспособность и функциональная активность фибробластов при взаимодействии с матриксом бактериальных биопленок» (договор № М19-007 от 02.05.2019), № госрегистрации 20191399 от 19.06.2019. Для работы использовались фибробласты из образцов здоровой кожи, утилизируемых в процессе проведения пластических операций (блефаропластика), всего было получено 20 образцов. Протокол исследования утвержден локальным этическим комитетом ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» (протокол № 3 от 06.06.2019). Культивирование фибробластов выполнялись в условиях клинико-диагностической лаборатории ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Для получения первичных культур использовали метод механической дезагрегации (ме-

тод эксплантатов) [5]. Образцы кожи, измельченные до размеров примерно 1-3 мм², переносили на культуральные чашки Петри размером 35 мм, накрывали покровным стеклом и культивировали в 1 мл среды, состоящей из 90% DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, с добавлением антибиотиков (100 мгк/мл гентамицина, 100 мкг/мл ванкомицина, 50 мгк/мл амфотерицина В). Смена среды проводилась каждые 2-3 дня. Радиальный рост клеток по периметру кожных фрагментов наблюдался в среднем на 5-10-е сутки, с формированием монослоя через 14-20 суток. Далее проводили субкультивирование фибробластов в новые чашки Петри. Для перевода клеток в суспензию монослой обрабатывали 0,25% раствором трипсина с 0,025% раствором Версена (в соотношении 1:3). Для пересева культуры применяли суспензию с концентрацией клеток 5×10^4 /мл. Пассажи проводили при достижении клетками 75-100%-й конfluence, для пассажей использовали питательную среду без добавления антибиотика. Для исследования применяли культуру клеток 4-5 пассажа, которая по литературным данным соответствует по своим характеристикам молодым фибробластам. Культура, подготовленная к эксперименту, представляла собой монослой с типичным рисунком в виде «завитков». Анализ кариотипа показал, что клетки являются диплоидными и имеют 46 хромосом.

Для получения матрикса биопленки использовали клинические штаммы *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* из рабочей коллекции, сохраненные на предварительном этапе НИР в растворе криопротектора (10% раствор глицерина в питательном бульоне в соотношении 1:1) при температуре -70°C. Штаммы бактерий характеризовались выраженной способностью формировать биопленку, анализ которой предварительно проводили по собственной методике (Патент Республики Беларусь № 20326). Штаммы восстанавливали путем культивирования в жидкой питательной среде, затем производили высеив на плотную питательную среду с выделением чистой культуры. Для

моделирования формирования биопленки использовали стерильные предметные стекла, которые помещали вертикально во флаконы с питательной средой. Во флакон вносили 1 мл бульонной культуры в концентрации 5×10^8 КОЕ/мл, инкубировали 3 часа при температуре 37°C и после этого добавляли питательную среду в объеме 40 мл. Биопленку выращивали в течение 72 часов. После окончания культивирования стекла из флаконов извлекали пинцетом, трижды промывали от не прикрепившихся клеток в буферном растворе. Для получения внеклеточного матрикса биопленку соскабливали с поверхности покровного стекла с помощью скребка для клеточных культур, добавляли минимальный объем изотонического раствора хлорида натрия. Полученную суспензию фильтровали через мембранные фильтры, с размером пор 0,2 мкм [2, 6].

В чашки Петри помещали культуры фибробластов, в посевной дозе 5×10^4 /мл ($5\ 000/\text{см}^2$). В питательную среду для фибробластов добавляли 0,150 мл фильтрата матрикса биопленки. В качестве контроля использовали фибробласты такого же пассажа, но без добавления матрикса. Длительность эксперимента составила 7 дней. Состояние клеток контролировали ежедневно, основные показатели экспериментального исследования представляли по результатам культивирования 3-х и 7-х суток. Культуры исследовали прижизненно на универсальном инвертированном микроскопе (Nicon, Япония) с применением методов светлого поля при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. Оценивали структурные особенности клеток и монослоя в целом. Дополнительно использовали окраску по Романовскому-Гимзе.

Для описания пролиферативной активности фибробластов оценивали время удвоения культуры (ВУ) и индекс пролиферации (ИП) по следующим формулам [7]:

$$\text{ВУ} = t \times \lg 2 / \lg (N_t / N_0), \text{ ИП} = N_2 / N_1,$$

где, t – время инкубации (ч); N_0 – начальная доза клеток на пластике; N_t – количество клеток, выросших за время t ; N_1 – количество клеток монослоя, принятое как

исходное; N_2 – количество клеток монослоя через 24 часа культивирования.

Количество клеток оценивали с помощью анализатора Cell Dyn Ruby (Abbott, США). Плотность монослоя определяли исходя из количества клеток, образующихся в динамике. Количество клеток, равное 1×10^4 /мл, соответствовало 1×10^4 /см² чашки Петри.

Оценку цитотоксичности компонентов матрикса биопленки проводили по разнице активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культуральной среде и клетках монослоя. ЛДГ присутствует в цитоплазме живых клеток и выделяется в среду клеточной культуры через протечки мембран мертвых или поврежденных клеток, нарушенных под воздействием токсического агента. Культуральную среду отбирали в эппендорфы и центрифугировали. Сохранившиеся на носителе клетки разрушали путем двукратного замораживания-оттаивания. Отбирали по 1 мл культуральной среды и лизата клеток. Для определения ЛДГ использовали диагностические наборы производства Abbott Laboratories (Германия). Исследования выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Architect С8000, («АВВОТТ» США). Количество поврежденных клеток выражали как процентное отношение активности ЛДГ в среде к суммарной активности ЛДГ в лизате и в ростовой среде:

$$\text{ПК} (\%) = (\text{ЛДГ}_\text{с} / \text{ЛДГ}_\text{л} + \text{ЛДГ}_\text{с}) \times 100,$$

где ПК – количество поврежденных клеток, ЛДГ_с – активность ЛДГ в среде; ЛДГ_л – активность ЛДГ в лизате [8].

Определение иммунофенотипа получаемых клеток выполняли с помощью проточной цитофлуориметрии [9, 10, 11]. Клеточную суспензию фибробластов в количестве $3,5 \times 10^6$ кл/1 мл фосфатно-солевого буфера инкубировали с панелью конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. Измерения проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACSCanto II с программным обеспечением FACSDiva (Becton Dickinson, США). Оценивали экспрессию CD34,

CD45, CD14, HLA-DR, CD73, CD44, CD10, CD90, CD105, виментина. Оценку жизнеспособности культивированных фибробластов проводили с использованием флуоресцирующего ДНК-красителя 7-AAD (7-амино-актинолизин). Указанный краситель используется для изучения проницаемости цитоплазматической мембраны в результате потери транспортной функции. 7-AAD позволяет отличить живые клетки от мертвых и апоптотических [9]. Дополнительно оценивали экспрессию маркера апоптоза CD95.

В работе были применены общепринятые методы выражения результатов с использованием встроенных модулей лицензионной программы «STATISTICA 6.1» (StatSoft Inc., США, регистрационный номер GS-35F-589). Результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха ($Me [Q_1; Q_3]$). Для проверки равенства медиан нескольких выборок применяли критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты исследования

Оценка пролиферативной активности фибробластов

На 3-и сутки после культивирования в контрольной группе клетки имели характерную веретенообразную форму, с хорошо визуализируемым ядром овальной формы, гомогенной цитоплазмой, с отростками. Фибробласты четко контурировали, имели ровные границы оболочки. На 7-е сутки наблюдалось увеличение количества клеток. Фибробласты располагались плотно друг к другу, формируя тяжи. Клетки имели по 2-4 отростка разной длины, с помощью которых соседние клетки соединялись между собой, в результате чего формировался конфлюэнтный монослой. Культуры контрольной группы достигали плотности на 7-е сутки после посева, что указывало на хорошую пролиферативную способность клеток в отсутствие компонентов матрикса биоупленки.

В опытной группе установлено влияние компонентов матрикса биоупленки Г+ и Г- бактерий на состояние культуры фибробла-

стов при проведении совместного культивирования *in vitro*. В наибольшей степени пролиферативную активность фибробластов угнетал матрикс биоупленки Г- бактерий, среди которых самые низкие значения плотности монослоя, ИП и самые высокие показатели ВУ были получены для биоупленки *P. aeruginosa*. Кроме того, после культивирования с матриксом биоупленки *P. aeruginosa* регистрировались выраженные изменения клеток монослоя. На 3-и сутки по сравнению с контролем наблюдалось отсутствие фиксации части клеток к пластику, фибробласты находились в питательной среде, имели округлую форму. К 7-м суткам отслаивание клеток от поверхности чашки Петри увеличилось. При совместном культивировании с матриксом биоупленки других видов бактерий также выявлялись клетки с нарушением структурной организации – цитоплазматические включения, вакуоли, пикноз ядра, однако степень их выраженности была меньше, чем для опытных случаев с *P. aeruginosa*. Таким образом, компоненты матрикса *P. aeruginosa* оказывали наиболее выраженное воздействие на адгезию клеток, а также на способность распластываться и формировать монослой. Показатели пролиферативной активности фибробластов, полученные при культивировании с матриксом *K. pneumoniae* и *S. aureus* были практически идентичны, для *E. faecalis* выявлено наименьшее влияние на пролиферативную активность, показатели приближались к значениям контрольной группы (таблица 1).

Оценка цитотоксичности матрикса биоупленки

Результаты ЛДГ-теста показали, что доля поврежденных клеток в присутствии матрикса биоупленки отличается от таковой в контрольной культуре на всех сроках культивирования, что говорит о цитотоксичности матрикса биоупленки Г+ и Г- бактерий. Максимальное относительное содержание поврежденных клеток выявлено при совместном культивировании с матриксом *P. aeruginosa*. Значения, полученные после постановки опыта с секретируемыми компонентами

Таблица 1 – Показатели пролиферативной активности фибробластов на 3-и и 7-е сутки культивирования

Показатель	Контроль	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
3-и сутки					
Плотность монослоя, кл/мм ²	530 [495; 580]	380 [365; 392]	200 [170; 250]*	400 [350; 420]	480 [452; 489]
Индекс пролиферации, отн. ед.	2,2 [2,4; 2,9]	1,6 [1,5; 1,8]	1,2 [1,1; 1,5]*	1,8 [1,6; 2,0]	2,1 [1,9; 2,2]
Время удвоения, ч	21 [20,8; 21,5]	29,5 [27; 33]	36 [31; 40,8]*	29 [27; 31]	23 [22; 26]
7-е сутки					
Плотность монослоя, кл/мм ²	3520 [3480; 3615]	1800 [1700; 1940]	1500 [1100; 1700]*	2000 [1800; 2300]	3200 [2700; 3280]
Индекс пролиферации, отн. ед.	1,5 [1,4; 1,7]	1,4 [1,3; 1,9]	1,2 [1,2; 1,6]*	1,4 [1,3; 1,9]	1,5 [1,3; 1,6]
Время удвоения, ч	45,4 [44,5; 52]	55,2 [54; 60,0]	72,5 [69; 74,0]*	33 [32; 34]	41 [39; 44]

Примечание: * – отмечены наибольшие различия среди сравниваемых групп, жирным шрифтом выделены значимые различия по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

K. pneumoniae, *S. aureus*, *E. faecalis*, были сходными (таблица 2).

Оценка иммунофенотипа фибробластов

Проведена оценка экспрессии основных маркеров, характеризующих фибробласты. В процессе проточной цитофлуориметрии для опытных и контрольной группы выделялась достаточная популяция клеток по прямому и боковому светорассеянию, на которых отсутствовали гемопоэтические и эндотелиальные маркеры CD31, CD34 (1,3% [0,8; 1,5]), CD45 и CD14 (0,9% [0,3; 1,6]), HLA-DR (0,1% [0,05;

0,2]). Выделенные в рамках гейта клетки имели иммунофенотип: CD44⁺, CD90⁺, виментин⁺, CD73⁺, CD10⁺, CD105⁺.

В ходе опыта происходило снижение степени экспрессии для ряда основных иммунофенотипических маркеров фибробластов, регистрировалось увеличение количества 7-AAD положительных клеток и уровня апоптоза по CD95. На 3-и сутки культивирования с матриксом биоупленки Г⁺ и Г⁻ бактерий изменения были выражены для уровня экспрессии CD10, CD44, CD73, CD90 (рисунок 1).

Таблица 2 – Результаты ЛДГ-теста при определении цитотоксичности матрикса биоупленки Г⁺ и Г⁻ бактерий

Показатель	Активность ЛДГ в среде, ЕД/л	Активность ЛДГ в лизате клеток, ЕД/л	% поврежденных клеток в чашке Петри, Ме
3-и сутки			
Контрольная группа	35 [28; 43]	220 [190; 250]	14 %
<i>K. pneumoniae</i>	110 [100; 140]	225 [230; 320]	32,8 %
<i>P. aeruginosa</i>	170 [160; 180]*	249 [240; 310]*	40,5 %*
<i>S. aureus</i>	97 [90; 120]	232 [220; 243]	29,5 %
<i>E. faecalis</i>	86 [82; 95]	225 [205; 230]	27,6 %
7-е сутки			
Контрольная группа	39 [30; 45]	250 [220; 270]	13,5 %
<i>K. pneumoniae</i>	135 [135; 156]	255 [235; 300]	34,6 %
<i>P. aeruginosa</i>	196 [171; 210]*	255 [240; 285]	43,5 %*
<i>S. aureus</i>	135 [125; 144]	255 [218; 270]	34,6 %
<i>E. faecalis</i>	108 [99; 118]	258 [224; 271]	29,5 %

Примечание: * – отмечены наибольшие значения среди сравниваемых групп, жирным шрифтом выделены значимые различия по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

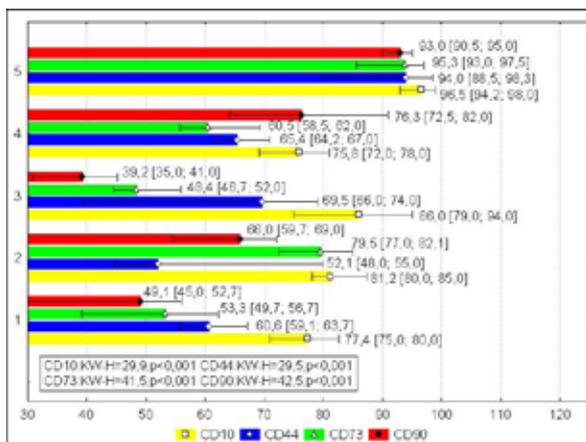
Среди Г- бактерий в наибольшей степени потеря маркеров проявлялась при взаимодействии с матриксом биопленки *P. aeruginosa*. Уровень экспрессии CD95 составил 49,1 % [45,0; 52,7]. Необходимо отметить, что под влиянием биопленки *S. aureus* также наблюдалась выраженное снижение CD90 на фибробластах до 39,2 % [35,0; 41,0]. Значительное влияние *P. aeruginosa* и *S. aureus* оказывали на экспрессию CD73. В меньшей степени проявлялось влияние биопленки Г+ и Г- на CD10 – степень экспрессии оставалась выше 75% по значениям медианы. Среди всех видов бактерий наибольшее влияние на экспрессию CD44 оказывала биопленка *K. pneumoniae* – на 3-и сутки уровень CD44 составил 52,1 % [48,0; 55,0]. Минимальное влияние на иммунофенотип фибробластов оказывал матрикс биопленки *E. faecalis*: на 3-и сутки более 60% фибробластов были CD44+, CD90+, CD73+, CD10+. Степень экспрессии виментина и CD105 (ко-рецептор для трансформирующего фактора роста) оставалась достаточной на 3-и сутки и составляла более 80% для опытных групп и более 95% для контроля. По данным маркерам проводилось гейтирование фибробластов.

Биопленка Г- бактерий (*P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*) в большей степени, чем Г+ бактерий (*S. aureus*, *E. faecalis*) способствовала развитию апоптоза и гибели фибробластов. На 3-и сутки опыта с *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* относительное содержание 7-AAD положительных фибробластов составляло 35,0 % [33,0; 37,0] и 39,3 % [37,0; 41,0], соответственно. Уровень апоптоза (по экспрессии CD 95) был сходным. Влияние на жизнеспособность и апоптоз фибробластов биопленки Г+ бактерий в ранние сроки исследования было выражено в меньшей степени. Минимальное влияние оказывал матрикс биопленки *E. faecalis*: на 3-и сутки количество нежизнеспособных клеток составляло 28,7 % [25,5; 30,5], клеток в апоптозе – 19,8 % [18,4; 21,0] (рисунок 2).

С увеличением сроков культивирования до 7-и суток относительное содержание поврежденных фибробластов и потеря поверхностных CD маркеров увеличивалось.

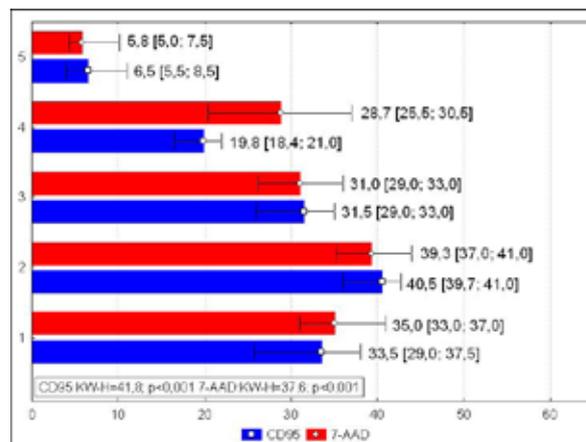
Обсуждение

В настоящее время доказано, что хронические раны являются типичной патологией, ассоциированной с биопленкой.



1, 2, 3, 4, 5 – обозначения для результатов, полученных при культивировании с матриксом биопленки *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, и контроля, соответственно; KW-H – критерий Краскела-Уоллиса, p – уровень значимости различий между группами

Рисунок 1 – Изменение степени экспрессии маркеров фибробластов после культивирования с матриксом биопленки Г+ и Г- бактерий (3-и сутки)



1, 2, 3, 4, 5 – обозначения для результатов, полученных при культивировании с матриксом биопленки *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, и контроля, соответственно; KW-H – критерий Краскела-Уоллиса, p – уровень значимости различий между группами

Рисунок 2 – Изменение степени экспрессии CD 95 и 7-AAD на фибробластах после культивирования с матриксом биопленки Г+ и Г- бактерий (3-и сутки)

Достаточное количество публикаций доказывает трансформацию бактерий из планктонной формы в биопленку и ее первостепенную патогенетическую роль в задержке раневого заживления [12]. Для хронической раны характерно состояние пролонгированного патологического воспаления, нарушение эпителиальной миграции и роста грануляционной ткани, что обусловлено повреждающим действием компонентов бактериальной биопленки на клетки соединительной ткани [13]. Несмотря на доказанное присутствие биопленки в хронических ранах, ее роль в патогенезе нарушения репарации остается не ясной. Учитывая колонизацию раны биопленкой, представляется актуальным исследование эффектов последней на фибробласты. В представленной работе проанализировано влияние матрикса биопленки Г+ и Г- бактерий на пролиферативную активность и иммунофенотип фибробластов в культуре, проведена оценка цитотоксичности. В аналогичных исследованиях было показано действие биопленки *S. aureus* на миграцию, жизнеспособность, морфологию и индукцию апоптоза фибробластов. Обнаружено также изменение уровня секреции фибробластами биологически активных веществ – цитокинов (интерлейкинов-6, 8, фактора некроза опухоли), факторов роста (эндотелиального сосудистого фактора роста, трансформирующего фактора роста), матриксных металлопротеиназ [14].

Оценка иммунофенотипа фибробластов является обязательной при определении подлинности культуры, а также позволяет охарактеризовать различные клеточные процессы – активацию, пролиферацию, межклеточную кооперацию и т.д. Так, CD90 – поверхностный клеточный антиген, в норме регулирует адгезию фибробластов, организацию цитоскелета и миграцию клеток. CD10 идентифицирует поверхностную нейтральную эндопептидазу (Zn-зависимая металлопротеиназа, неприлизин) и является общим маркером лимфоидных предшественников. Вне лимфоидной системы CD10 экспрессируется на многих стромаль-

ных и эпителиальных клетках, в фибробластах кожи соответствует белку-эластазе. Известно, что CD44 играет важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции. Это рецептор для гиалуроновой кислоты, а также для коллагена и металлопротеиназ матрикса. Воздействие компонентов биопленки Г+ и Г- приводило к снижению экспрессии основных поверхностных иммунофенотипических маркеров фибробластов – CD10, CD44, CD73, CD90, степень их потери была различной в зависимости от вида бактерий (рисунок 1).

Заключение

Таким образом, результаты эксперимента свидетельствовали о влиянии компонентов матрикса биопленки Г+ и Г- бактерий на состояние культуры фибробластов здоровой кожи при проведении совместного культивирования *in vitro*.

Сравнительный анализ показал, что в наибольшей степени пролиферативную активность фибробластов угнетал матрикс биопленки Г- бактерий, преимущественно *P. aeruginosa*. Компоненты матрикса *P. aeruginosa* оказывали наиболее выраженное воздействие на адгезию клеток, на их способность распластываться и формировать монослой, а также характеризовались наиболее высокой цитотоксичностью по результатам ЛДГ-теста. Показатели пролиферативной активности фибробластов, полученные при культивировании с матриксом *K. pneumoniae* и *S. aureus*, были практически идентичны, для *E. faecalis* выявлено наименьшее влияние на пролиферативную активность. Воздействие компонентов биопленки Г+ и Г- бактерий приводило к снижению экспрессии основных поверхностных иммунофенотипических маркеров фибробластов – CD10, CD44, CD73, CD 90, степень их потери была различной в зависимости от вида бактерий. Биопленка Г- бактерий (*P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*) в большей степени, чем Г+ бактерий (*S. aureus*, *E. faecalis*) способствовала развитию апоптоза (по CD95) и гибели (по 7-AAD) фибробластов.

Полученные результаты могут быть основой для определения патогенеза нарушений пролиферации и объяснения механизмов возникновения хронической раны в условиях инфекционного процесса, обусловленного бактериями-продуцентами биопленки. Установление таким образом ведущего патогена, влияющего на скорость репарации, будет полезным при интерпретации результатов микробиологического исследования хронических ран, точные критерии которого до сих пор не определены [15].

Исследование было выполнено при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) по теме НИР «Жизнеспособность и функциональная активность фибробластов при взаимодействии с матриксом бактериальных биопленок» (договор № М19-007 от 02.05.2019), № госрегистрации 20191399 от 19.06.2019.

Библиографический список:

1. Чеботарь, И.В. Матрикс микробных биопленок / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Н.А. Маянский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т. 18, № 1. – С. 9-19.
2. Роль компонентов матрикса во взаимодействии бактериофагов с бактериями биопленок / Г.В. Тец [и др.] // Практическая пульмонология. – 2017. – № 3. – С. 55-57.
3. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения / А.И. Зорина [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI, № 2. – С. 15-26.
4. Шурыгина, И.А. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 8-12.
5. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешни; пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – С. 221-226.
6. Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок / И.Р. Си-монова [и др.] // Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2017. – № 1. – С. 73-79.
7. Исследование биологической совместимости биопластического материала «Гиаматрикс» на культуре дермальных фибробластов / И.Р. Гильмутдинова [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17, № 2(2). – С. 268-272.
8. Тестирование аддитивных материалов на культурах клеток фибробластов человека / Г.П. Котельникова [и др.] // Журнал имени академика Б.В. Петровского. – 2018 – Т. 6, № 2. – С. 67-73.
9. Войткова, В.В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии (обзор литературы) / В.В. Войткова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 76, № 6. – С. 220-225.
10. Применение аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи лица. Результаты годичных исследований / В.Л. Зорин [и др.] // Эстетическая медицина. – 2012. – Т. XI, № 2. – С. 171-182.
11. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов / Г.А. Трусов [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 16-24.
12. Kirker, K.R. In vitro studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review / K.R. Kirker, G.A. James // APMIS. – 2017. – Vol. 125. – P. 344-352.
13. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro / R. Jeffery Marano [et al.] / Sci. Rep. – 2015. – Issue 5, 13296. – 11 p.
14. Differential effects of planktonic and biofilm MRSA on human fibroblasts / K.R. Kirker [и др.] // Wound Repair Regen. – 2012. – Vol. 20. – P. 253-261.
15. Российские национальные рекомендации. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. 2-ое изд. допол / под ред. Гельфанда Б.Р., Козлова Р.С., Кубышкина В.А., Хачатряна Н.Н. – М., 2015. – 109 с.

Y. Yarets

**BACTERIAL BIOFILM MATRIX: CYTOTOXICITY, EFFECTS
ON PROLIFERATIVE ACTIVITY AND THE DEGREE OF
EXPRESSION OF FIBROBLAST SURFACE MARKERS**

The effect of the biofilm matrix of gram-positive (G+) and gram-negative (G-) bacteria on the state of fibroblast culture of healthy skin during co-cultivation *in vitro* was analyzed. Comparative analysis showed that the proliferative activity of fibroblasts was inhibited to the greatest extent by the matrix of the biofilm of G bacteria, mainly *P. aeruginosa*. The components of the *P. aeruginosa* matrix had the most pronounced effect on cell adhesion, their ability to spread and form a monolayer, and were also characterized by the highest cytotoxicity according to the results of the LDH test. The indicators of the proliferative activity of fibroblasts obtained by cultivation with the matrix of *K. pneumoniae* and *S. aureus* were almost identical, for *E. faecalis* the least influence on proliferative activity was revealed. Exposure to biofilm components G+ and G- led to a decrease in the expression of immunophenotypic markers of fibroblasts – CD10, CD 44, CD73, CD90, the degree of their loss was different depending on the type of bacteria. Biofilm of G- bacteria, to a greater extent than G+ bacteria, contributed to the development of apoptosis (according to CD95) and death (according to 7-AAD) of fibroblasts.

Key words: *bacterial biofilm, biofilm matrix, fibroblasts, flow cytometry, cytotoxicity, proliferative activity*

Поступила 20.08.2020