

Матрикс микробных биопленок

И.В. Чеботарь¹, А.Н. Маянский², Н.А. Маянский¹

¹ ФГАУ «Научный центр здоровья детей», Москва, Россия

² ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

Обзор литературы посвящен обобщению информации, касающейся системообразующего атрибута микробных биопленок — внеклеточного матрикса. Проанализированы структурно-биохимические характеристики матрикса, формируемого актуальными видами патогенов. Детально описаны функции матрикса, включая его патогенетическую значимость в эволюции инфекционного процесса. Матрикс рассматривается в качестве индикатора биопленочного процесса и имеет диагностическую ценность. В связи

с этим в обзоре концентрируется внимание на методах обнаружения и изучения матрикса. Предложены фармацевтические и немедикаментозные пути контроля патогенетически значимых биопленок через дезорганизацию их матрикса. Обсуждается возможность использования матриксных структур в качестве компонентов вакцинных препаратов.

Ключевые слова: бактерии, микроскопические грибы, биопленки, внеклеточный матрикс, антибиопленочная терапия.

Matrix of Microbial Biofilms

I.V. Tchebotar¹, A.N. Mayanskiy², N.A. Mayanskiy¹

¹ Scientific Center of Children's Health, Moscow, Russia

² Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

This literature review was aimed to summarize information on an extracellular matrix, which is one of the most important components of microbial biofilms. Structural and biochemical characteristics of biofilms matrix produced by the most common pathogens are reviewed. The matrix functions, including its role in the natural course of infectious process are described in detail. The matrix is considered as an indicator of biofilm forming and has some diagnostic value; therefore, this review focuses

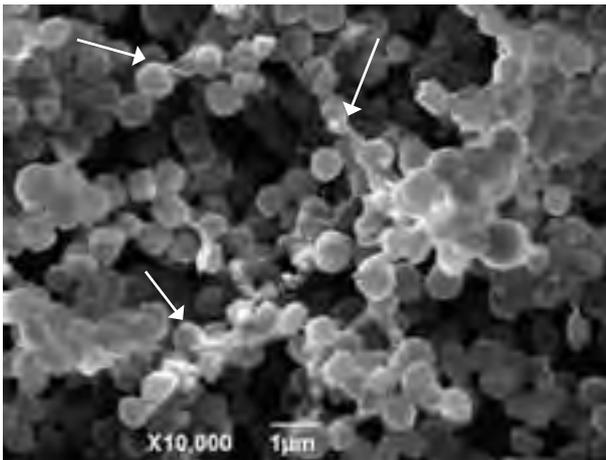
on the matrix detection and characterization methods. Pharmacological and non-pharmacological approaches to the management of biofilms through the disorganization of their matrix are proposed in this article. A potential for the use of matrix substances as the active components of vaccines is also discussed.

Key words: bacteria, fungi, biofilms, extracellular matrix, anti-biofilm therapy.

Контактный адрес:
Игорь Викторович Чеботарь
Эл. почта: nizarnn@yandex.ru

Микробы, находясь в организме или окружающей среде, могут существовать в двух формах — свободно плавающей, или планктонной, и закрепленной (сессильной) в составе биопленок. Основоположники учения о биопленках R.M. Donlan и J.W. Costerton определяли биопленки как «образованные оседлыми микробами сообщества, характеризующиеся тем, что клетки, прикрепленные к субстрату или поверхности друг друга, погружены в матрикс, образованный внеклеточными полимерными субстанциями; при этом микробы проявляют особый фенотип, зависящий от фазы роста и экспрессии генов» [1]. Позднее толкование термина биопленки было упрощено. Сейчас оно звучит примерно так: микробные биопленки — это локализованные на интерфейсе сообщества микробных клеток, ассоциированных с внеклеточным матриксом. Как видно, эта трактовка концентрирует внимание на двух неотъемлемых атрибутах биопленки — микробах и связывающем их в единую систему внеклеточном матриксе.

Внеклеточный матрикс, объединяя микробные клетки в единую систему, выполняет структурообразующую функцию (рисунок). Именно поэтому архитектура биопленки во многом определяется особенностями матрикса. Все элементы биопленочного матрикса можно разделить условно на две группы: (1) матричные биополимеры, синтезируемые микробами, и (2) структуры матрикса, захваченные микробами из окружающей среды.



Биопленка, образованная *S. aureus*. Стафилококки связаны в единую систему при помощи внеклеточного матрикса. Стрелками обозначены наиболее контрастные участки матрикса. Сканирующая электронная микроскопия, ув. $\times 10\,000$.

Электроннограмма препарата, подготовленного авторами, получена д.б.н., проф. А.Г. Погореловым (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино).

Первая группа может быть представлена полисахаридами, экстрацеллюлярной ДНК, белками. Об участии липидов в структурировании биопленок имеются единичные сообщения [2]. Перечисленные биополимеры секретируются микробными клетками целенаправленно для строительства матрикса либо могут быть дериватами погибших микробных клеток. Более подробная информация о молекулярных основах матрикса, синтезируемого микробами, сконцентрирована в табл. 1.

Структура биопленки зависит от участвующих в прикреплении микробов к матриксу и подложке адгезивных структур (пилей, адгезивных белков, липополисахаридов и др.), расположенных на поверхности клеток. Однако только редкие из них могут включаться в строительство матрикса. Пример, когда поверхностный адгезивный белок золотистого стафилококка SasG (от англ. «*Staphylococcus aureus* surface [protein]») становится элементом внеклеточного матрикса, наблюдается только в тех случаях, когда его первичная структура обретает 5 и более одинаковых повторов аминокислотных последовательностей [3].

Состав немикробных составляющих матрикса определяется микроокружением биопленки. В поврежденных тканях в состав матрикса встраиваются тканевые и плазменные белки и их производные (фибрин и различные компоненты системы гомеостаза), фибронектин, фрагменты антител и системы комплемента, клеточные дериваты (протеино-нуклеиновые комплексы, остатки клеточных мембран) и другие субстанции. На слизистых оболочках открытых полостей (рот, кишечник, влагалище и др.) матрикс дополняется производными разрушенных эпителиоцитов, биополимерами естественных секретов, а при патологии — компонентами воспалительного экссудата. В частности, в ротовой полости в структуру матрикса включаются элементы ротовой жидкости (муцин и амилаза слюны, плазменные белки из десневой жидкости), дериваты разрушенных эпителиоцитов и микробных клеток, компоненты пищи, нерастворимые отложения солей и другие вещества. В целом, состав немикробных составляющих матрикса определяется газовым, температурным, кислотным и субстратным микроокружением, малейшие флуктуации которых могут повлиять на его качественные и количественные параметры.

Особый интерес вызывает феномен «читинга» (от англ. cheating — обман, мошенничество). Суть его заключается в том, что даже дефектные по способности синтезировать биопленочный матрикс микробные клетки могут участвовать в биопленкообразовании, используя для закрепления матриксные

Таблица 1. Молекулярная характеристика наиболее важных элементов внеклеточного матрикса микробного происхождения биопленок, сформированных актуальными микробами-оппортунистами

Микроорганизм, сформировавший биопленку	Молекулярная основа элементов внеклеточного матрикса	Ссылка
<i>Staphylococcus aureus</i>	Поли- β -1,6-N-ацетилглюкозамин (PNAG от англ. «poly- β -(1-6)-N-acetylglucosamine») или PIA (более ранний синоним от англ. «polysaccharide intercellular adhesin»)	[4]
	Протеин Вар (от англ. «biofilm associated protein»)	[5]
	ДНК	[6]
	Протеин Rbf (от англ. «regulator of biofilm formation»)	[7]
	Молекулы протеина SasG (от англ. « <i>Staphylococcus aureus</i> surface [protein]») с 5 и более одинаковыми повторами аминокислотных последовательностей	[3]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Протеин А	[8]
	PNAG	[4]
	Протеин Aap (от англ. «accumulation-associated protein»)	[9]
	Sbp (от англ. «small basic protein»)	[10]
<i>Enterococcus</i> spp.	ДНК	[11]
	Протеин Esp (от англ. «enterococcal cell surface-associated protein»)	[12]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ДНК	[13]
	Альгинат	[14]
	Psl-полисахарид с высоким содержанием маннозы (от англ. «polysaccharide synthesis locus»)	[15]
	Pel-полисахарид с высоким содержанием глюкозы (от англ. «pellicule»)	[15]
	Протеин CdrA (от англ. «diguanylate-regulated partner A»)	[16]
	Рамнолипиды	[14]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ДНК	[17]
	PNAG	[18]
	Вар-подобный протеин <i>A. baumannii</i>	[19]
<i>Escherichia coli</i>	ДНК	[20]
	PNAG	[21]
	Уридин-дифосфат-глюкоза-4-амино-4-деокси-1-арабиноза (UDP — 4-amino-4-deoxy-1-arabinose)	[22]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Колановая кислота, содержащая гексасахарид с высоким содержанием фукозы и глюкуроновой кислоты	[22]
	PNAG	[23]
<i>Candida albicans</i>	β -1,3-глюканы с высоким содержанием D-глюкозы, α -D-маннозы, α -L-рамнозы и N-ацетилглюкозамина	[24]
	ДНК	[25]

полимеры, продуцируемые другими микробами [26]. В этом случае формируются полимикробные биопленки, а понятие о «небиопленкообразующих микроорганизмах» теряет смысл.

Важной функцией матрикса является механическая стабилизация биопленки, направленная на сохранение компактно организованных биопленочных микроорганизмов. При этом матрикс, оставаясь системой, иммобилизующей биоплен-

ку, способен динамически изменяться. В ответ на воздействие окружающей среды биопленочный матрикс перестраивается пассивно либо активно. Пассивная перестройка матрикса происходит за счет захвата (сорбции) веществ, укрепляющих его (нерастворимые белки, клеточные дериваты и т.д.), либо в результате действия повреждающих факторов (иммунные эффекторы, ферменты, антибиотики и др.), которые дезинтегрируют биопленку.

Активная модификация осуществляется биопленочными микробами. Микробозависимая перестройка матрикса реализуется за счет противонаправленных процессов, активация которых зависит от конкретной ситуации. Они включают усиление продукции матричных биополимеров, синтез дестабилизирующих матрикс ферментов, усиленное размножение клеток и их аутолиз, активацию специфического захвата биополимеров из внешней среды и отторжение биопленочных составляющих в окружающую среду. Именно такими путями в условиях динамического хаоса идет эволюция остова биопленки.

Матрикс является биохимически активной системой. С одной стороны, внутри матрикса накапливаются микробные ферменты, которые секретируются клетками или высвобождаются в результате их распада (спонтанного аутолиза либо спровоцированного антимикробными веществами разрушения микробов). Часто биопленочные ферменты играют защитную роль, разрушая неблагоприятные для биопленочных микробов вещества. Важным примером такого феномена является концентрирование β -лактамаз в матриксе биопленок, сформированных *Pseudomonas aeruginosa* [27]. Это обеспечивало гидролиз цефтазидима, что приводило к существенному увеличению выживаемости бактерий в составе биопленок. Минимальная доза, вызывающая распад биопленок, превышала минимальную бактерицидную концентрацию цефтазидима в 16 раз.

С другой стороны, сам биопленочный матрикс обладает сильными сорбционными свойствами для внешних субстанций. В биопленках, образованных *P. aeruginosa*, глицерол-фосфорилированные β -1-глюканы активно связывали молекулы аминокликозидов, а альгинатная слизь инактивировала тобрамицин [28]. Слизистый матрикс стафилококковых биопленок нейтрализовывал оксациллин, ванкомицин, тейкопланин, цефотаксим [28, 29]. В-1,3-глюканы матрикса биопленок *S. albicans* активно связывали флуконазол, делая биопленочные клетки устойчивыми для терапевтических концентраций этого препарата [24]. Эти и подобные многочисленные наблюдения позволяют сделать вывод о том, что сорбционная функция является общим свойством матрикса всех микробных биопленок.

Матрикс не только механически связывает биопленку в единую структуру, но и заполняет межклеточные пространства, образуя трехмерную фильтрующую систему. Это позволило назвать матрикс «молекулярным фильтром» [30]. Архитектура и плотность матрикса неоднородна: биопленку пронизывают каналы, снабжающие кластеры бактерий материальными ресурсами и отводящие продукты метаболизма. Канализованность зрелых и накопив-

ших достаточный объем биопленок — важное условия выживания бактерий в их глубоких слоях.

Матрикс защищает биопленку от термических, осмотических и кислотно-щелочных стрессов. Ярким примером этого являются свойства колановой кислоты, которая служит матрикс-образующим полимером биопленок *E. coli* [31].

Матрикс может служить источником питания. При нехватке питательных веществ в денальных биопленках, основу которых составлял *Streptococcus mutans*, бактерии начинали ферментировать фруктаны, входящие в структуры экстрацеллюлярного биопленочного матрикса, и использовать их в качестве питательного субстрата [32]. Все перечисленные свойства являются основой для реализации глобальной функции матрикса — поддержания благоприятного химического постоянства в микроокружении биопленочных микробов.

Понимание ключевой роли матрикса в существовании биопленки открывает перспективы фармакологического управления биопленочным процессом путем воздействия на матрикс. Чтобы не отойти от задач настоящего обзора, мы умышленно не затрагиваем вопросы управления биопленкой через уничтожение микроорганизмов, а ограничиваемся анализом путей воздействия на матрикс. Говоря о патологических биопленках, под фармакологическим контролем понимают их эрадикацию. В этом случае воздействие должно приводить к деградации и разрушению матрикса. Пути его дестабилизации могут быть прямыми и косвенными. Прямые пути могут опосредоваться веществами, непосредственно реагирующими с молекулами матрикса. К числу дестабилизирующих матрикс субстанций относятся ферменты, окислители, детергенты, полиионы. Один из первых способов матрикс-зависимой борьбы с биопленками был реализован на основе фармацевтического препарата дисперсин В (Kane Biotech Inc.) [33]. Действующим веществом дисперсина является β -1,6-глюкозаминидаза (фермент группы гликозил-гидролаз с массой 42кДа, синтезируемый бактериями рода *Actinobacillus*), мишенью для которой служат *поли- β -1,6-N-ацетилгликозаминовые* (PNAG) компоненты матрикса [34]. Дисперсин В гидролизует матрикс биопленок, сформированных *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Bordetella* spp. [35, 36]. Эффективность дисперсина В синергидно повышают некоторые антимикробные препараты: хлоргексидин, триклозан, цефамандол и др. [35, 37].

Изучено множество других матрикс-разрушающих ферментов, на основе которых могут быть созданы фармакологические препараты. В зависимости от молекулярной базы матрикса антибиопленочным эффектом могут обладать альгинат-лиаза

(мишень — альгинат синегнойных биопленок), гиалуронидаза (мишень — гиалуронан *Streptococcus intermedius*), нуклеазы (мишень — внеклеточная ДНК), протеазы, включая трипсин, химотрипсин, протеиназу К (мишень — белковые компоненты матрикса) [35, 38]. На фармацевтическом рынке стали появляться мультиферментные препараты, позиционируемые производителями как антибиопленочные. Примером таких препаратов является линия InterFase (компания ProThera Inc, США), созданная на основе глюкоамилазы, хитозаназы, гемицеллюлазо-пектиназного комплекса, протеазо-пептидазного комплекса, лизоцима и β -глюканазы (данные с сайта ProThera Inc; режим доступа: <https://www.protherainc.com>). Разрушающая способность InterFase была доказана на биопленках *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Candida paratropicalis*.

Следует отметить, что начало успешному применению антибиопленочных ферментов было заложено эмпирически задолго до осознания патогенетической роли биопленок. В частности, для лечения типичной биопленочной патологии — легочного муковисцидоза — с 60-х годов двадцатого века успешно применялись ингаляции ДНКазы (современные аналоги — «Пульмозим», «Дорназа альфа» и др.) [39]. Её действие направлено на разжижение мокроты, основу которой при муковисцидозе составляют биопленки золотистого стафилококка, синегнойной палочки, гемофильной палочки, буркхольдерий и др.

Вторая потенциальная стратегия дестабилизации матрикса основана на способности некоторых веществ окислять полисахариды. Наличие полисахаридного компонента в матриксе уже около 10 лет диагностируется с помощью периодата натрия [40]. Считается, что если периодат натрия дезорганизует биопленку, то её матрикс построен с участием полисахаридов. Вероятно поэтому периодат натрия стал одним из действующих веществ дезинфектанта КВИ, главным достоинством которого является антибиопленочный эффект (материалы с сайта компании Kane Biotech Inc.: <http://www.kanebiotech.com>). К сожалению, токсичность периодата натрия не позволяет создать на его основе препарат для внутреннего применения.

В качестве возможных деструкторов матрикса могут выступать детергенты. Было показано, что те биопленки *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, матрикс которых не ассоциирован с PNAG, разрушаются додецилсульфатом натрия [41]. 0,05%

додецилсульфат натрия в комплексе с 0,5% леулиновой кислотой обеспечивал удаление биопленок, сформированных практически всеми кариогенными стрептококками [42]. Биопленки *P. aeruginosa* разрушались под влиянием другого детергента — полисорбата 80 в концентрациях порядка 0.001% [43]. Матрикс-зависимое действие полисорбата подтверждалось тем, что он действовал только на те штаммы, которые не продуцировали Psl-матрикс [44]. Молекулы Psl-матрикса оказались устойчивыми к полисорбату.

Прямое разрушение матрикса возможно и альтернативными методами. М. Sharma и соавт. продемонстрировали позитивные результаты фотодинамической деструкции матрикса [45]. Используя в качестве фотосенсибилизатора синий толуидин О и облучая биопленки в красном диапазоне (640 нм), они индуцировали почти полное растворение биопленочного матрикса *S. aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Перспективным можно считать еще один физический способ деструкции внеклеточного матрикса биопленок *S. aureus* — метод обработки биопленок холодной плазмой [46].

Косвенное (непрямое) воздействие на матрикс реализуется за счет управления реакциями микробного метаболизма. Наиболее перспективным является воздействие, которое направлено на рассогласование сигналов в системе кворум-сенсинга, что ведет к подавлению синтеза матриксных полимеров и продукции ферментов, дестабилизирующих матрикс [47]. Кандидаты на матрикс-зависимое подавление биопленок являются химически неоднородными веществами. Скорее всего, они действуют через конкуренцию с сигнальными молекулами кворум-сенсинга или ингибируют их продукцию. Наиболее известными из них являются ацетилцистеин и фураноны. Антибиопленочное действие ацетилцистеина доказано в отношении большого количества грампозитивных, грамотрицательных бактерий и даже грибов [48, 49]. Примером антибиопленочных фуранонов является усниновая кислота (usnic acid, или 2,6-диацетил-7,9-дигидрокси-8,9b-диметил-1,3(2H,9bH)-добензофурандион), обладающая не только прямым антимикробным действием, но и повреждающая сформированные биопленки [50].

Проводя мероприятия, направленные на разрушение матрикса, следует помнить, что его дезинтеграция может привести к высвобождению массы живых микробов и, следовательно, к диссеминации возбудителя, что повышает риск генерализации инфекционного процесса.

Обнаружение матрикса — главное звено в диагностике биопленочного процесса [51]. Диагностическое значение матрикса было оценено

уже в первых работах, описывающих биоплёнку на поверхности медицинских устройств, инфицированных стафилококками, кандидами и коринебактериями [52, 53]. Именно на основе обнаружения матричных структур при помощи электронной микроскопии был сделан вывод об особой форме существования микробов — биоплёнках. Самым наглядным методом визуализации матрикса, а значит — обнаружения биопленки, является электронная микроскопия (см. рисунок). К сожалению, методы рутинной световой микроскопии не позволяют регистрировать матричные биополимеры из-за их наноразмерной толщины.

Для выявления матрикса традиционно используется ряд методов, основанных на его окраске. Например, конго ред окрашивает один из видов биоплёночного матрикса, включающего в свой состав глюкозамин (в меньшей степени — глюкозу и ксилосу) [53, 54]. Следует отметить, что конго ред имеет недостаток: он не реагирует с неуглеводными типами матрикса патогенных биоплёнок — белковым и ДНК-матриком. А эти виды матрикса могут быть определяющими в биоплёночном росте некоторых патогенных бактерий [55–57]. Более совершенным является специфическое окрашивание матричных биополимеров при помощи специальных наборов флуоресцентных красителей (например «FilmTracer™ Sypro® Biofilm Matrix Stain», Invitrogen), позиционируемых фирмами-изготовителями в качестве препаратов для выявления матрикса.

Перспективным неразрушающим методом прижизненного изучения биоплёночного матрикса является рамановская микроскопия — исследование поверхности микрообъектов с помощью анализа спектров комбинационного рассеивания света и определение элементного (то есть химического) состава исследуемого субстрата. Этот метод был успешно применен для исследования химической гетерогенности биоплёночного матрикса *P. aeruginosa* [58]. Позднее при помощи одного из вариантов рамановской микроскопии — поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (англ. «surface-enhanced Raman scattering» или SERS) была произведена успешная дифференцировка близких по структуре видов полисахаридного матрикса *E. coli* и *Raoultella planticola* [59]. На основе рамановской микроскопии был предложен и запатентован в США способ идентификации биоплёнок [60].

Оригинальный метод, созданный по принципу классической реакции энзим-меченных антител (англ. enzyme-linked immunosorbent assay, или ELISA), был предложен для идентификации различных вариантов полисахаридного матрикса

[60]. Метод называется «реакция энзим-меченных лектинов» (англ. enzyme-linked lectinsorbent assay, или ELLA) и подразумевает использование лектинов (вместо антител, реагирующих с антигенами), которые должны специфически распознавать углеводные компоненты внеклеточного биоплёночного матрикса. Успешное испытание метода позволило дифференцировать разные штаммы *Stenotrophomonas maltophilia* и *Staphylococcus sciuri* на основе определения в составе их матриксов разных соотношений D-глюкозы или D-маннозы (реакция с конканавалином А) и N-ацетил-D-глюкозамина или N-ацетилнейраминовой кислоты (реакция с агглютинином зародышей пшеницы) [60]. Перспективность реакции энзим-меченных лектинов ограничивает только одно — во многих биоплёнках матрикс может не включать в свой состав углеводных компонентов. В таких случаях предлагаемый метод становится бесполезным.

Другие методы идентификации матрикса связаны с обнаружением специфических антигенов. Еще в середине 90-х годов прошлого века был идентифицирован антиген, специфичный для биоплёнок *S. epidermidis*. Он состоял примерно из 130 β -1,6-связанных 2-деокси-2-амино-D-глюкопиранозильных остатков, более 80% которых были N-ацелированы, и позднее был назван полисахаридным межклеточным адгезином (англ. акроним — PIA) [61]. Теоретически существование подобных антигенов позволяет разработать простые и воспроизводимые иммунохимические методы обнаружения биоплёночного матрикса в материале от больного. Это означает, что эволюция иммунохимического определения антигенов матрикса могла бы привести к созданию наборов для идентификации наиболее важных биоплёнкообразующих патогенов. К сожалению, значительного прогресса в этом направлении за последние 15 лет не достигнуто, и диагностика биоплёнок активнее развивается по другим направлениям, о которых сказано ниже.

Отдельное направление выявления биопленочного матрикса основано на идентификации генов, связанных с биоплёнкообразованием. У штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, которые были изолированы от пациентов с уроинфекциями, при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) была выявлена прямая корреляция между способностью формировать биоплёнки *in vitro* и наличием в геноме *icaA*- и *icaD*-генов, входящих в состав *ica*-оперона, контролирующего выработку слизистого матрикса и процессы межклеточной адгезии, связанные с формированием биоплёнки [62]. Позднее были обнаружены матрикс-контролирующие гены *Enterococcus faecalis* (*fsg*-локус, являющийся гомологом *ica* стафило-

кокков), *S. pneumoniae* (42 гена и 8 промоторов), *P. aeruginosa* (локусы хромосомы *pel* и *psl*, отвечающие за синтез белков, вовлеченных в продукцию полисахаридного матрикса, а также генный кластер *bac*, контролирующий синтез «протеина, ассоциированного с биоплёнками») [51]. Функциональные гомологи подобных генов охарактеризованы практически у всех важнейших биоплёнообразующих возбудителей.

Таким образом, сегодня предложено множество апробированных вариантов диагностики биопленочного процесса, основанных на выявлении внеклеточного матрикса.

Биопленочный матрикс усиливает адгезию/колонизацию, обладает инвазивным потенциалом, способствует персистенции возбудителя в организме за счет того, что обеспечивает ускользание патогена от иммунной системы. Адгезивность — общее свойство разных типов биопленочного матрикса. PNAG/PIA индуцировал адгезию золотистых стафилококков на эпителиальных клетках назального и легочного эпителия, эндотелия и эпителия мочевыводящих путей [63, 64]. Вар обеспечивал адгезию ацинетобактерий на эпителиальных клетках человека [65]. Матриксная ДНК инициировала неспецифическое закрепление стафилококков на разнообразных поверхностях [66]. Аар опосредовал адгезию эпидермального стафилококка к эпителиальным клеткам (корнеоцитам) [67]. *Psl* вызывал фиксацию синегнойной палочки на культуральных клетках эпителиального происхождения [68]. У мутантов *Salmonella enteric*, способных продуцировать Вар, снижалась способность к колонизации желудочно-кишечного тракта [69].

В научной литературе встречается крайне мало информации о роли матрикса в инвазии возбудителя. Все сведения ограничиваются описанием факторов инвазии, ассоциированных с матриксом. По образному выражению J. Wingender и H.C. Flemming, биопленочный матрикс — это «резервуар ферментов», которые используются бактериями для выживания, инвазии и агрессии [70]. Из матрикса биопленок *P. aeruginosa* были выделены щелочная протеаза (*ArgA*), аминопептидаза, протеаза IV (*PrpL*), эластазы *LasA* и *LasB*, белки наружной мембраны семейства OMP [71]. Многие из них были обнаружены в составе везикул наружной мембраны, которые также были ассоциированы с матриксом [71]. Все перечисленные субстанции являются важными факторами инвазии и агрессии. Подобные наблюдения сделаны и в отношении матрикса биопленок *S. aureus*. В составе матрикса были обнаружены известные факторы инвазии и агрессии золотистого стафилококка, включая лей-

коцидин, нуклеазу, сериновую протеазу, дериваты гемолизина [72]. Ферменты инвазии попадают во внеклеточное 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 предстоит исследовать.

Биопленочный матрикс способствует ускользанию микробов от атаки иммунных эффекторов и, в первую очередь, от фагоцитов. Об этом свидетельствует огромное количество фактов. PIA, организующий матрикс биопленок *S. epidermidis*, снижал активацию фагоцитов, ингибируя фагоцитарный клиренс биопленочных бактерий [73, 74]. Важный фактор биопленочного матрикса PNAG актуального периодонтопатогена *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* угнетал макрофагальный фагоцитоз [75]. PIA *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 [76]. Экстрацеллюлярный полисахарид *Streptococcus mutans*, повышал выживаемость стрептококков в системе с нейтрофилами примерно в два раза за счет двукратного снижения продукции кислород-реактивных продуктов нейтрофилов; секреторная дегрануляция при этом не изменялась [77].

Альгинат синегнойного матрикса подавлял γ -интерферон-зависимый киллинг бактерий макрофагами человека: только индуцированные γ -интерфероном нейтрофилы были способны убивать планктонные (не связанные с альгинатом) синегнойные бактерии, но и эта способность блокировалась, когда в систему добавляли альгинат [78]. Ранее считалось, что низкая эффективность фагоцитоза в биоплёнках *P. aeruginosa* объясняется механическим барьером, который создает внеклеточный матрикс между иммунными эффекторами (фагоциты, антитела, комплемент) и бактериальными клетками [79]. Однако позднее выяснилось, что элементы матрикса могут оказывать на фагоциты (нейтрофилы) более изощренное воздействие, подавляя лишь отдельные функции нейтрофилов. Матрикс синегнойных биопленок (даже в отсутствие клеток *P. aeruginosa*) избирательно блокировал направленность хемотаксиса нейтрофилов [80].

Матрикс защищал биопленочные микробы и от растворимых эффекторов иммуните-

та. Опсонизация комплементом не могла нейтрализовать антифагоцитарные свойства матрикса: PNAG защищал *S. aureus* от комплемент-зависимого фагоцитоза нейтрофилами [73]. Способность биоплёночных клеток *P. aeruginosa* активировать комплемент была существенно ниже, чем у планктонных форм [81]. Авторы связывают это с важным компонентом внеклеточного матрикса синегнойных биоплёнок — альгината. Альгинат, который сам по себе не активирует комплемент, мог обладать как маскирующим эффектом, так и связывать двухвалентные катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , необходимые для эффективной активации комплемента [81].

Неисследованным остается непосредственное участие элементов матрикса микробного происхождения в интоксикации, сопровождающей инфекционный процесс. Парадоксально, но такая, казалось бы, интересная тема, остается абсолютно неизученной, что открывает новое перспективное поле в исследовательской деятельности.

Биополимеры микробного матрикса могут стать основой разработки новых высокоэффективных вакцин. Роль матриксных структур в создании вакцин может быть двоякой. С одной стороны, элементы матрикса могут выполнять функции адъювантов. Еще в 70-х годах прошлого века были вскрыты адъювантные свойства альгината синегнойной палочки [82]. В настоящее время альгинат пытаются применить самостоятельно либо в комплексе с другими биополимерами (хитозан) для конструкции систем доставки, обеспечивающих планомерное выделение иммуногена в организме и обладающих сильными адъювантными свойствами [83, 84]. Особый интерес к альгинату возникает как к адъюванту-носителю, перспективному для создания пероральных вакцин [84]. С другой стороны, микробные полимеры могут играть роль специфических вакцинных иммуногенов. В качестве вакцинного антигена предложено

использовать компоненты полисахаридного матрикса стафилококковых биопленок. В частности, достаточной протективной иммуногенностью обладает деацетилированный PNAG [85]. Вакцину на его основе планируют использовать для профилактики стафилококковых девайс-ассоциированных инфекций. Вакцина на основе протеина VirA (от англ. *Bordetella intermediate protein A*), поверхностно располагающегося на клетках и ассоциированного с биопленками *Bordetella pertussis*, прошла успешные лабораторные испытания на мышах [86]. Убежденность авторов в том, что эта вакцина станет более эффективной, чем традиционные цельноклеточные и ацеллюлярные вакцины, базируется на доказанном участии биопленок в патогенезе коклюша. Продолжаются попытки использовать антигены мукоидных экзополисахаридов (в том числе — альгината) *P. aeruginosa* с целью создания вакцин для профилактики синегнойных осложнений муковисцидоза [87–89].

Заключение

Внеклеточный матрикс микробных биопленок — это сложная многофункциональная система, объединяющая микроорганизмы в единое целое. Глобальная цель существования матрикса состоит в повышении выживаемости микробов. Применительно к биопленкам, имеющим патогенетическое значение, это означает, что матрикс является фактором патогенеза инфекционного процесса и препятствием для антимикробной терапии. Следовательно, при проведении медикаментозной эрадикации возбудителя необходимо учитывать возможность существования биопленок. Информация о микроструктурных и биохимических основах различных вариантов биопленочного матрикса, а также о путях их регуляции способна стать теоретической базой для фармацевтического контроля биопленочных процессов.

Литература

1. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167-93.
2. Tetz V.V., Korobov V.P., Artemenko N.K., et al. Extracellular phospholipids of isolated bacterial communities. *Biofilms* 2004; 1(3):149-55.
3. Corrigan R.M., Rigby D., Handley P., Foster T.J. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology* 2007; 153(6):2435-46.
4. Mack D., Becker P., Chatterjee I., et al. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol* 2004; 294(2):203-12.
5. Cucarella C., Solano C., Valle J., et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183(9):2888-96.
6. Mann E.E., Rice K.C., et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS one* 2009; 4(6):e5822.
7. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. *Журн микробиол* 2011; 1:101-8.
8. Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., et al. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2009; 191(3):832-43.

9. Rohde H., Burdelski C., Bartscht K., et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* 2005; 55(6):1883-95.
10. Decker R., Burdelski C., Zobiak M., et al. An 18 kDa scaffold protein is critical for *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *PLoS pathogens* 2015; 11(3):e1004735.
11. Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B. Differential roles of poly-n-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(2):470-6.
12. Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Shankar N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2005; 187(17):6213-22.
13. Barnes A.M., Ballering K.S., Leibman R.S., Wells C.L., Dunny G.M. *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *MBio* 2012; 3(4):e00193-12.
14. Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Руднева Е.И., Чистякова В.П. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса. *Мол генетика микробиол вирусол* 2012; 1:3-8.
15. Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10(6):644-8.
16. Starkey M., Hickman J.H., et al. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* 2009; 191(11):3492-503.
17. Mulcahy H., Charron-Mazenod L., Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens* 2008; 4(11): e1000213.
18. Choi A.H., Slamti L., Avci F.Y., Pier G.B., Mair-Litran T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol* 2009; 191:5953-63.
19. Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Масалов Я.К., Михайлович В.М., Маянский Н.А. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства. *Вестник РАМН* 2014; 9-10:39-50.
20. Sahu P.K., Iyer P.S., Oak A.M., Pardesi K.R., Chopade B.A. Characterization of eDNA from the clinical strain *Acinetobacter baumannii* AIIMS 7 and its role in biofilm formation. *The Scientific World J* 2012; 2012:973436.
21. Cerca N., Jefferson K.K. Effect of growth conditions on poly-N-acetylglucosamine expression and biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 283(1):36-41.
22. Laverty G., Gorman S.P., Gilmore B.F. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens* 2014; 3(3):596-632.
23. Chen K.M., Chiang M.K., Wang M., et al. The role of pgaC in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation. *Microb pathog* 2014; 77:89-99.
24. Mathé L., Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr genetics* 2013; 59(4):251-64.
25. Martins M., Uppuluri P., Thomas D.P., et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopatholog* 2010; 169(5):323-31.
26. Boyle K.E., Heilmann S., van Ditmarsch D., Xavier J.B. Exploiting social evolution in biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16(2):207-12.
27. Hengzhuang W., Ciofu O., Yang L., et al. High β -lactamase levels change the pharmacodynamics of β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(1):196-204.
28. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2012; 14(1):51-8.
29. Farber B.F., Kaplan M.H., Clogston A.G. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis* 1990; 161(1):37-40.
30. Dunne W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):155-66.
31. Chen J., Lee S.M., Mao Y. Protective effect of exopolysaccharide colanic acid of *Escherichia coli* O157:H7 to osmotic and oxidative stress. *Int J Food Microbiol* 2004; 93:281-6.
32. Burne R.A., Chen Y.Y., Wexler D.L., Kuramitsu H., Bowen W.H. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains with defects in fructan metabolism assessed in a program-fed specific-pathogen-free rat model. *J Dent Res* 1996; 75(8):1572-7.
33. Kaplan J.B. Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int J Artif Organs* 2009; 32(9):545-54.
34. Ramasubbu N., Thomas L.M., Ragunath C., Kaplan J.B. Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Mol Biol* 2005; 349(3):475-86.
35. Arciola C.R., Montanaro L., Costerton J.W. New trends in diagnosis and control strategies for implant infections. *Int J Artif Organs* 2011; 34(9):727-36.
36. Parise G., Mishra M., Itoh Y., Romeo T., Deora R. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* 2007; 189(3):750-60.
37. Donelli G., Francolini I., Romoli D., et al. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(8):2733-40.
38. Kaplan J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 2010; 89(3):205-18.
39. Cushing I.E., Miller W.F. Nebulization therapy. *Clin Anesth* 1964; 1:169-218.

40. Frank K.L., Patel R. Poly-N-Acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun* 2007; 75(10):4728-42.
41. Izano E.A., Wang H., Ragunath C., Ramasubbu N., Kaplan J.B. Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS. *J Dent Res* 2007; 86(7):618-22.
42. Wang B.Y., Hong J., Ciancio S.G., Zhao T., Doyle M.P. A novel formulation effective in killing oral biofilm bacteria. *J Int Acad Periodontol* 2012; 14(3):56-61.
43. Toutain-Kidd C.M., Kadiva, S.C., Bramante C.T., Bobin S.A., Zegans M.E. Polysorbate 80 inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its cleavage by the secreted lipase LipA. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(1):136-45.
44. Zegans M.E., Wozniak D., Griffin E., et al. *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl promotes resistance to the biofilm inhibitor polysorbate 80. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(8):4112-22.
45. Sharma M., Visai L., Bragheri F., et al. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(1):299-305.
46. Cotter J.J., Maguire P., Soberon F., et al. Disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a remote non-thermal gas plasma. *J Hosp Infect* 2011; 78(3):204-7.
47. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стратегия управления бактериальным биопленочным процессом. *Журнал инфектологии* 2012; 4(3):5-13.
48. Schwandt L.Q., Weissenbruch R.V., Stokroos I., et al. Prevention of biofilm formation by dairy products and N-acetylcysteine in voice prostheses in an artificial throat. *Acta Otolaryngol* 2004; 124(6):726-31.
49. Dinicola S., De Grazia S., Carlomagno G., Pintucci J.P. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(19):2942-8.
50. Francolini I., Norris P., Piozzi A., Donelli G., Stoodley P. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(11):4360-5.
51. Чеботарь И.В., Гурьев Е.Л. Лабораторная диагностика клинически значимых биопленочных процессов. *Вопр диагностики в педиатрии* 2012; 4:15-20.
52. Marrie T.J., Nelligan J., Costerton J.W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 1982; 66:1339-41.
53. Behmlander R.M., Dworkin M. Biochemical and structural analyses of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 1994; 176(20):6295-303.
54. Black W.P., Yang Z. *Myxococcus xanthus* chemotaxis homologs DifD and DifG negatively regulate fibril polysaccharide production. *J Bacteriol* 2004; 186(4):1001-8.
55. Hansen U., Hussain M., Villone D., et al. The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol* 2006; 25:252-60.
56. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(9):623-33.
57. Montanaro L., Poggi A., Visai L., et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs* 2011; 34(9):824-31.
58. Sandt C., Smith-Palmer T., Pink J., Brennan L., Pink D. Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in situ. *J Appl Microbiol* 2007; 103(5):1808-20.
59. Ivleva N.P., Wagner M., Horn H., Niessner R., Haisch C. Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393(1):197-206.
60. Leriche V., Sibille P., Carpentier B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(5):1851-6.
61. 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):175-83.
62. Gad G.F., El-Feky M.A., El-Rehewy M.S., et al. Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(5):342-51.
63. Lin M.H., Shu J.C., Lin L.P., et al. Elucidating the crucial role of poly N-acetylglucosamine from *Staphylococcus aureus* in cellular adhesion and pathogenesis. *PloS one* 2015; 10(4):e0124216.
64. Costa A.R., Henriques M., Oliveira R., Azeredo J. The role of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) in *Staphylococcus epidermidis* adhesion to host tissues and subsequent antibiotic tolerance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28(6):623-9.
65. Brossard K.A., Campagnari A.A. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* 2012; 80(1):228-33.
66. Das T., Sharma P.K., Busscher H.J., van der Mei H.C., Krom V.P. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(10):3405-8.
67. Macintosh R.L., Brittan J.L., Bhattacharya R., et al. The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes. *J Bacteriol* 2009; 191(22):7007-16.
68. Byrd M.S., Pang B., Mishra M., Swords W.E., Wozniak D.J. The *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF- κ B activation in A549 cells. *MBio* 2010; 1(3):e00140-10.
69. Latasa C., Roux A., Toledo-Arana A., et al. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* 2005; 58(5):1322-39.

70. Wingender J., Flemming H.C. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 13:623-33.
71. Toyofuku M., Roschitzki B., Riedel K., Eberl L. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res* 2012; 11(10):4906-15.
72. Gil C., Solano C., Burgui S., et al. Biofilm matrix exo-proteins induce a protective immune response against *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect Immun* 2014; 82(3):1017-29.
73. 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):6868-76.
74. Fredheim E.G., Granslo H.N., Flægstad T., et al. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 63(2):269-80.
75. 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):173-80.
76. 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):269-75.
77. 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):437-44.
78. 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):7512-8.
79. Kharazmi A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Lett* 1991; 30(2):201-5.
80. Hansch G.M., Brenner-Weiss G., Prior B., Wagner C., Obst U. The extracellular polymer substance of *Pseudomonas aeruginosa*: too slippery for neutrophils to migrate on? *Int J Artif Organs* 2008; 31(9):796-803.
81. Jensen E.T., Kharazmi A., Garred P., et al. Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb Pathog* 1993; 15(5):377-88.
82. Pier G.B. Vaccine potential of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate). *Antibiot Chemother* 1991; 44:136-42.
83. Sarei F., Dounighi N.M., Zolfagharian H., Khaki P., Bidhendi S.M. Alginate nanoparticles as a promising adjuvant and vaccine delivery system. *Indian J Pharm Sci* 2013; 75(4):442-9.
84. Biswas S., Chattopadhyay M., Sen K.K., Saha M.K. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydr Polym* 2015; 121:403-10.
85. Arciola C.R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5:7.
86. de Gouw D., Serra D.O., de Jonge M.I., et al. The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. *Emerg Microbes Infect* 2014; 3(8):e58.
87. Pier G.B., DesJardin D., Grout M., et al. Human immune response to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate) vaccine. *Infect Immun* 1994; 62(9):3972-9.
88. Stanislavsky E.S., Lam J.S. *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. *FEMS Microbiol Rev* 1997; 21(3):243-77.
89. Theilacker C., Coleman F.T., Mueschenborn S., et al. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. *Infect Immun* 2003; 71(7):3875-84.