

УДК 579.86:616.153.96:616.717/.718-002.2

ЗАВИСИМОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЛКОВОГО СОСТАВА СЫВОРОТКИ КРОВИ ОТ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОСТЕОМИЕЛИТИЧЕСКОГО ОЧАГА

Осипова Е.В., Талашова И.А., Шипицына И.В.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России», Курган, e-mail: office@ilizarov.ru

Изучена зависимость количественного состава белковых фракций сыворотки крови от способности к биопленкообразованию клинических штаммов, выделенных из свищей или из очага воспаления у 14 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. В исследование включены клинические штаммы, выделенные в монокультуре. Большая часть культур обладала способностью к образованию биопленок: 5 штаммов (*Staphylococcus aureus* – 3, *Staphylococcus epidermidis* – 1, *Enterococcus faecalis* -1) – низкой и 5 штаммов (*S. aureus* – 2, *S. epidermidis* – 1, Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* – 1, *Pseudomonas aeruginosa* – 1) средней. У 4-х изолятов способность к образованию биопленки отсутствовала (*S. aureus* – 1, MRSE -1, *S. hyicus* -1, *E. faecalis* -1). Для сравнения с данными электрофоретического исследования пациенты были распределены на 3 группы: первая – пациенты, у которых выделенные из свищей штаммы не обладали способностью к образованию биопленки на поверхности полистирола; вторая – обладали низкой; третья – средней способностью к биопленкообразованию. Обнаружение ряда значимых корреляционных связей: между способностью штаммов к образованию биопленки и содержанием общего белка ($r=0,56$, $p=0,005$); между биопленкообразованием и концентрацией β -глобулинов ($r=0,56$, $p=0,01$); между содержанием γ -глобулинов и способностью клинических изолятов к биопленкообразованию ($r=0,85$, $p=0,00003$), может свидетельствовать о том, что показатели белкового состава сыворотки крови отражают не только выраженность патологического процесса при хроническом остеомиелите, но и активность биопленочного воспаления.

Ключевые слова: биопленки, электрофорез белков, белковые фракции, хронический остеомиелит

DEPENDENCE OF THE PROTEIN COMPOSITION OF BLOOD SERUM FROM ADHESIVE PROPERTIES OF BACTERIA ISOLATED FROM OSTEOMYELITIC FOCUS

Osipova E.V., Talashova I.A., Shipitsyna I.V.

Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: office@ilizarov.ru

The dependence of the quantitative composition of the protein fractions of blood serum from the ability for biofilm formation of clinical isolates of the fistula or from the source of inflammation in 14 patients with chronic osteomyelitis of long bones. The study included clinical strains isolated in a monoculture. Most of the crops have the ability to form biofilms: 5 strains (*Staphylococcus aureus* – 3, *Staphylococcus epidermidis* – 1, *Enterococcus faecalis* -1) – Low and 5 strains (*S. aureus* – 2, *S. epidermidis* – 1, Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* – 1, *Pseudomonas aeruginosa* – 1) medium. In 4 isolates the ability to form biofilms absent (*S. aureus* – 1, -1 MRSE, *S. hyicus* -1, -1 *E. faecalis*). For comparison with the data of electrophoretic study, patients were divided into 3 groups: – patients who have isolated strains of fistulas do not possess the ability to form a biofilm on the surface of polystyrene; second – had low; third – medium capacity for biofilm formation. The discovery of a number of significant correlations: between the ability of the strains to biofilm formation and the content of total protein ($r = 0,56$, $p = 0,005$); between biofilm formation and β -globulin concentration ($r = 0,56$, $p = 0,01$); between the content of γ -globulins and the ability of clinical isolates to biofilm formation ($r = 0,85$, $p = 0,00003$), may indicate that the protein composition of indicators of blood serum not only reflect the severity of the pathological process in chronic osteomyelitis, but also the activity of biofilm inflammation.

Keywords: biofilm, protein electrophoresis, protein fractions, chronic osteomyelitis

Изучению белкового состава сыворотки крови при различных патологических процессах, в том числе и при остеомиелите, посвящены многочисленные исследования. Изменение спектра сывороточных белков у больных остеомиелитом выражается в виде гипо- и диспротеинемии, уменьшении удельного веса альбуминов и возрастании относительного содержания глобулинов [11]. При этом выраженность патологических проявлений остеомиелитического процесса на организменном уровне зависит не только от обширности повреждения, ре-

активности организма, стадии болезни, но и свойств микробов, заселяющих очаг воспаления [4].

В последнее время в патогенезе хронического остеомиелита большое значение уделяется роли бактериальных биопленок [12]. Свойства бактерий в биопленках отличаются от таковых у изолированных клеток, что оказывает влияние на взаимодействие микроба с организмом человека, в том числе и факторы иммунной защиты. С особенностями выживания бактерий в биопленках в значительной степени связана хронизация

инфекции, переход микробов к длительной персистенции и неэффективность антимикробной терапии [7]. В связи с чем, интерес представляет изучение характера белкового спектра и, главным образом, количественных изменений глобулинов, свидетельствующих о напряженности антибактериального иммунитета [8] в зависимости от способности микроорганизмов к биопленкообразованию.

Цель нашего исследования – провести сравнительный анализ количественных показателей белкового состава сыворотки крови и уровня биопленкообразования клинических штаммов бактерий, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей.

Материалы и методы исследования

В работе представлены результаты однократного исследования фракционного состава белков сыворотки крови, выполненного перед оперативным вмешательством, и способности к биопленкообразованию клинических штаммов, выделенных из свищей в дооперационном периоде или из очага воспаления во время оперативного вмешательства у 14 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. В группу исследования были включены 5 мужчин и 9 женщин в возрасте от 22 до 66 лет (средний возраст составил 60,5 лет (40,8 лет; 65,0 лет)).

Электрофоретическое разделение и идентификацию фракций белков сыворотки крови проводили с помощью автоматического электрофоретического анализатора SAS-1plus, автоматической системы обработки гелей SAS-2 (Helena Biosciences Europe, Великобритания) и программного обеспечения Platinum III. Общий белок (ОБ) сыворотки крови определяли с использованием автоматического биохимического анализатора HITACHI 902 (США) и реагентов фирмы «VitalDiagnostics» (Россия). В качестве контрольных значений использовали данные литературы [10].

Выделение чистой культуры штаммов проведено общепринятыми методами. Идентификация исследуемых штаммов выполнена на бактериологическом анализаторе WalkAway-40 Plus («Siemens», США).

Способность клинических штаммов формировать биопленки на поверхности 96-луночных полистироловых планшетов определяли по методу G.O'Toole и R. Kolter [13] с некоторыми изменениями в собственной модификации. Суточную бульонную культуру приводили к стандарту мутности 0,2 по McFarland стерильным мясо-пептонным бульоном (МПБ), что соответствовало 10^8 КОЕ/мл. В лунки планшета осторожно наливали по 200 мкл полученной микробной взвеси исследуемого штамма в 4 повторях с последующей инкубацией в термостате при 37°C. В качестве отрицательного контроля служили лунки со стерильным МПБ. Через 48 часов жидкую фазу из лунок осторожно удаляли, образовавшуюся на их поверхности биопленку трехкратно промывали 1,15М фосфатным буфером и окрашивали раствором генциан-виолета в течение 45 минут при комнатной температуре, после чего лунки трехкратно промывали фосфатным буфером. Для эстрагирования красителя вносили в лунки по 200 мкл этанола и инкубировали при комнатной температуре 45 минут. Затем

измеряли оптическую плотность (ОП) на фотометре ELx808 (BioTek, США) при длине волны 630 нм. Анализировали средние значения четырехкратных измерений. При значениях ОП<0,090 считали, что штаммы не обладали способностью к образованию биопленки; при значениях $0,090 < ОП \leq 0,180$ – рассценивали как низкую; при $0,180 < ОП \leq 0,360$ – как среднюю и при ОП >0,360 – как высокую способность к пленкообразованию.

Для оценки зависимости фракционного состава белков сыворотки крови от способности штаммов к биопленкообразованию определяли коэффициент Кендалла, критерии которого оценивали по шкале Чеддока: $0,1 < r_{xy} < 0,3$ – слабая; $0,3 < r_{xy} < 0,5$ – умеренная; $0,5 < r_{xy} < 0,7$ – заметная; $0,7 < r_{xy} < 0,9$ – высокая; $0,9 < r_{xy} < 1$ – весьма высокая.

Статистическую обработку данных исследования выполняли с помощью табличного редактора «Microsoft Excel – 2010» и программного обеспечения анализа данных AtteStat Версия 13.0 [3]. Цифровые данные представлены в виде медианы, 25% и 75% квартилей (Me (Q_{25} ; Q_{75})). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали критерий Вилкоксона. Различия считали существенными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы исследовали клинические штаммы, выделенные из ран в монокультуре. В 11 из 14 случаев это были стафилококки, в том числе *Staphylococcus aureus* (n=6) и коагулазоотрицательные стафилококки: *S. epidermidis* (n=2), Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) (n=2), *S. hyicus* (n=1). В одном случае был выделен представитель рода *Pseudomonas* – *Pseudomonas aeruginosa*, в двух – представитель семейства Streptococcaceae – *Enterococcus faecalis*.

Изучение биопленкообразующей способности клинических изолятов показало, что большая часть культур обладала способностью к образованию биопленок: 5 штаммов (*S. aureus* – 3, *S. epidermidis* – 1, *E. faecalis* – 1) – низкой и 5 штаммов (*S. aureus* – 2, *S. epidermidis* – 1, MRSE – 1, *P. aeruginosa* – 1) средней. У 4-х изолятов способность к образованию биопленки отсутствовала (*S. aureus* – 1, MRSE – 1, *S. hyicus* – 1, *E. faecalis* – 1). На основании чего для сравнения с данными электрофоретического исследования сывороточных белков пациенты были распределены на 3 группы: первая – пациенты, у которых выделенные из свищей штаммы не обладали способностью к образованию биопленки на поверхности полистирола; вторая – обладали низкой; третья – средней способностью к биопленкообразованию.

Содержание общего белка у пациентов соответствовало типу гипо- и диспротеинемии, что согласуется с данными литературы [11]. Необходимо отметить, что только

у пациентов третьей группы, клинические штаммы которых обладали средней способностью к биопленкообразованию, общий белок находился в пределах нормы, а изменение содержания альбумина было связано главным образом с увеличением концентрации β - и γ -глобулинов.

Из 14 пациентов только у 1-го количество альбумина находилось в пределах нормы, приближаясь к ее нижней границе. У остальных пациентов снижение альбумина сопровождалось одновременным увеличением одной или нескольких фракций глобулинов: α_1 -глобулинов (n=1); α_2 -глобулинов (n=2); β -глобулинов (n=2); γ -глобулинов (n=1); $\alpha_1 + \beta$ -глобулины (n=1); $\alpha_2 + \beta$ -глобулинов (n=1); $\beta + \gamma$ -глобулины (n=3); $\alpha_1 + \alpha_2 + \beta$ -глобулинов (n=1); $\alpha_1 + \beta + \gamma$ -глобулины (n=1).

Анализ результатов исследования белковых фракций сыворотки крови показал, что средние значения количества α_1 -глобулинов не выходили за границы контрольных показателей [10]. При этом у 4-х из 14-ти пациентов данный показатель был выше верхней границы нормы на 35-160%. В первой группе, где бактерии не обладали способностью к образованию биопленки, концентрация

α_1 -глобулинов у всех пациентов находилась в пределах нормы.

Увеличение концентрации α_2 -глобулинов на 14-21% по сравнению с контрольными значениями отмечено у 4-х пациентов.

Среднее значение количества β -глобулинов было выше нормы вследствие увеличения данного показателя на 13-38% у 9 пациентов, в том числе у четверых пациентов третьей группы.

Количество γ -глобулинов было повышено на 9-59% по сравнению с нормой у 5 пациентов в том числе у трех из третьей группы. У всех пациентов первой группы данный показатель не выходил за границы контрольных значений [10].

Альбумино-глобулиновый коэффициент (А/Г) отличался от нормы у всех пациентов, что было связано со снижением количества альбуминов и сопутствующим ему нарастанием фракций глобулинов, при этом отмечалось статистически значимое снижение данного показателя во второй и третьей группах по сравнению с первой.

Сопоставление показателей белкового спектра сыворотки крови и различной способности клинических штаммов к биопленкообразованию представлено в табл. 1.

Таблица 1

Белковый состав крови пациентов с хроническим остеомиелитом в зависимости от способности штаммов к биопленкообразованию

Белки сыворотки крови		Способность штаммов к биопленкообразованию		
		отсутствует (1 группа, n=4)	низкая (2 группа, n=5)	средняя (3 группа, n=5)
Общий белок	г/л	63,7 (62,4; 65,1)	62,2 (59,7; 62,2)	73,3 (67,0; 73,3)
Фракции белков:				
Альбумин	г/л	32,5 (32,3; 33,5)	28,7 (27,4; 29,4)*	32,4 (28,7; 32,9)
	%	51,5 (50,4; 53,2)	47,3 (42,2; 49,1) *	44,8 (44,2; 46,6) *
α_1	г/л	2,6 (2,2; 2,9)	3,3 (2,5; 4,7)	3,1 (2,3; 4,0)
	%	4,1 (3,5; 4,4)	5,3 (4,5; 7,0)	4,2 (3,4; 6,7)
α_2	г/л	8,8 (7,9; 9,9)	8,3 (8,0; 9,4)	8,2 (7,8; 9,7)
	%	13,9 (12,2; 16,0)	12,8 (12,2; 16,8)	12,5 (11,6; 13,2)
β	г/л	9,3 (9,0; 10,0)	8,2 (7,7; 9,7)	10,2 (9,5; 10,5)
	%	14,9 (14,3; 15,8)	13,7 (13,7; 15,6)	14,8 (13,9; 15,7)
γ	г/л	9,3 (8,2; 10,4)	10,3 (9,6; 14,1)	18,1 (12,6; 18,4) *
	%	14,6 (13,2; 16,0)	16,5 (16,1; 20,8)	23,8 (18,3; 25,5) *
А/Г	1,1 (1,0; 1,1)	0,9 (0,7; 1,0) **	0,8 (0,8; 0,9) **	

Различия значимы по сравнению с 1 группой: * – p<0,05; ** – p<0,01.

Корреляционный анализ показал, что имеется заметная связь между

- %способностью штаммов к образованию биопленки и содержанием общего белка ($r=0,56$, $p=0,005$);

- %биопленкообразованием и концентрацией β -глобулинов ($r=0,56$, $p=0,01$) в сыворотке крови.

Высокая зависимость выявлена между содержанием γ -глобулинов и способностью клинических изолятов к биопленкообразованию ($r=0,85$, $p=0,00003$).

Этиология и патогенез хронического остеомиелита связаны с микробными биопленками, оказывающими влияние на рецидивирующее течение заболевания, хронизацию воспалительного процесса и резистентность к антимикробным препаратам [12].

Способность к образованию биопленки является основным фактором вирулентности микроорганизмов. Факторы вирулентности грамположительных и грамотрицательных бактерий, оказывающих прямое и опосредованное воздействие на организм человека, часто имеют схожие механизмы и результаты действия. Опосредованное действие микробов на организм человека проявляется в нарушениях работы систем и органов, возникающих за счет действия собственных молекул, прежде всего цитокинов, выработку которых индуцируют бактерии [7].

Увеличение локальной продукции цитокинов (IL 1β , 2, 6, 12, 17; TNFa) отмечено при экспериментальной биопленочной инфекции. При этом высокая концентрация цитокинов, с одной стороны, является причиной миграции лимфоцитов, с другой – следствием инфильтрации очага воспаления различными популяциями лейкоцитов [15].

При исследовании сыворотки крови у больных хроническим остеомиелитом также отмечалось достоверное повышение уровня цитокинов (IL 1β , 2, 4, 6, 10; TNFa) [6].

Одним из проявлений синдрома системного воспалительного ответа при различных заболеваниях инфекционной природы, в том числе и при остеомиелите, инициированного гаммой вновь синтезированных цитокинов (IL 1, 6, 8, TNFa и т.д.), является нарушение белкового состава крови [1].

При анализе протеинограмм в нашем исследовании обращает на себя внимание снижение количества общего белка, альбуминов и сопутствующее им увеличение глобулинов.

Считается, что изменение содержания общего белка плазмы крови и качественного состава его фракций не являются специфическими, а отражают общий патологический

процесс, динамику и тяжесть заболевания. Вместе с тем известно, что хронические нарушения инфекционного происхождения ведут к гипопроотеинемии, выражающейся прежде всего гипоальбунемией, а в случае ведущей роли инфекционного фактора и к фазным изменениям в показателях глобулинов [8, 10].

Так, увеличение фракции α_1 -глобулинов наблюдается при острых и хронических воспалительных процессах. Один из основных компонентов данной фракции – α_1 -антитрипсин – ингибитор протеаз, источниками которых являются бактерии. При инфекционном воспалительном процессе происходит высвобождение протеаз из бактериальных клеток и лейкоцитов. При этом в отсутствие эффективных ингибиторов эти ферменты могут вызывать значительные повреждения тканей [8, 10].

Общая антитриптическая активность сыворотки определяется присутствием не только α_1 -антитрипсина, но и других ингибиторов трипсина, в том числе и α_2 -макроглобулина, который вместе с гаптоглобулином в основном и формирует фракцию α_2 -глобулинов. Макроглобулины представляют группу белков плазмы являющихся регуляторами иммунной системы, а также неспецифическими ингибиторами протеаз [8, 10].

Фракция β -глобулинов содержит компоненты комплемента, участвующие в реакциях иммунитета, и часть иммуноглобулинов. Ее повышение является показателем стимулирования защитных сил организма, так как белки системы комплемента, действуя в сочетании с иммуноглобулинами, опсонизируют и лизируют чужеродные агенты [8, 10]. Именно комплемент – важнейшая гуморальная система врожденного иммунитета – может активироваться биопленками [9].

Увеличение содержания γ -глобулинов обусловлено повышенной продукцией иммуноглобулинов классов G, A, M, D, E, представляющих собой антитела и обеспечивающих гуморальный иммунитет [8, 10]. Известно, что у больных хроническим остеомиелитом наблюдается выраженная гиперфункция В-гуморального иммунитета на фоне дефицита Т-клеточной системы иммунитета, что обусловлено длительной хронической интоксикацией организма из очага воспаления [2].

Заключение

В нашем исследовании мы обращали внимание на связь количественных отклонений белкового состава крови со способностью бактерий к биопленкообразованию. Полученные результаты свидетельствуют о различной способности микроорганиз-

мов, участвующих в развитии гнойных осложнений при остеомиелите к образованию биопленки, что свидетельствует о различиях в их вирулентных свойствах [5]. При этом необходимо отметить, что отсутствие или низкая способность к биопленкообразованию бактерий при исследовании *in vitro* не исключает возможности проявления данного свойства в других условиях [14].

Установлено, что в белковой формуле сыворотки крови происходят определенные сдвиги: с увеличением способности бактерий к биопленкообразованию более выраженным оказывалось уменьшение концентрации альбумина и значимое повышение уровня γ -глобулинов. Содержание α_1 - и α_2 -глобулинов в большинстве случаев оставалось в пределах нормы. Не выявлено существенных изменений в содержании β -глобулинов, хотя наблюдается тенденция к их росту с увеличением способности бактерий к биопленкообразованию. Обнаружение ряда значимых корреляционных связей может свидетельствовать о том, что показатели белкового состава сыворотки крови отражают не только выраженность патологического процесса при хроническом остеомиелите, но и активность биопленочного воспаления.

Список литературы

1. Акжигитов Г.Н., Юдин. Я.Б. Гематогенный остеомиелит. – М.: Медицина, 1998. – 288 с.
2. Аронович А.М., Коршок Н.Н. Иммунологический статус и способ лабораторного прогнозирования рецидива процесса у больных с хроническим остеомиелитом при лечении методом чрескостного остеосинтеза // Гений ортопедии. – 1996. – № 1. – С. 56-58.
3. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. – СПб.: ВХВ Петербург, 2004. – 505 с.
4. Герасимов А.М., Фурцева Л.Н. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
5. Романова Ю.М., Диденко Л.В., Толордава Э.Р. и др. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками // Вестник РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31-39.
6. Тевс Д.С., Лазаренко В.А., Калущий П.В. Нарушение цитокинового и гуморального звеньев адаптивного иммунитета и их коррекция у больных хроническим остеомиелитом костей стопы // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2013. – № 2, Т. VI, – С. 213-216.
7. Тец В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. – СПб.: КЛЕ_Т, 2006. – 128 с.
8. Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Загородный И.В. Клиническая биохимия (Учебное пособие для студентов медицинских вузов). – Москва. «Триада-Х». – 2002. – 504 с.
9. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета // Вестник РАМН. – 2012. – № 12. – С. 22-29.
10. Шевченко О.П., Долгов В.В., Олефиренко Г.А. Электрофорез в клинической лаборатории. Белки сыворотки крови. – Тверь: Изд-во: «Триада», 2006 г. – 160 с.
11. Шевцов В.И., Лапынин А.И., Ключин Н.М. Метод чрескостного остеосинтеза в лечении больных хроническим остеомиелитом. ГИПП «Заураль», 2001. – 221 с.
12. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH et al. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection // FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Jan; 52(1): 13-22.
13. O'Toole G.F., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Mol. Microbiol. – 1998. – № 30. – P. 295-304.
14. Palmer RJJr, Stoodley P. Biofilms 2007: Broadened Horizons and New Emphases // J Bacteriol 2007; 189 (22): 7948–60
15. Prabhakara R., Harro J.M., Leid J.G. et al. Murine immune response to a chronic *Staphylococcus aureus* biofilm infection // Infect. Immun. 2011; 79 (4): 1789–1796.