

УДК 617.586-0023:579.222:616-032  
https://doi.org/10.31612/2616-4868.5.2025.05

## МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК У ЗБУДНИКІВ СИНДРОМУ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ: ЗДАТНІСТЬ ДО АДГЕЗІЇ ТА ВЗАЄМОДІЯ В АСОЦІАЦІЯХ

Юлія В. Іванова<sup>1</sup>, Світлана М. Граматюк<sup>2</sup>, Ігор А. Криворучко<sup>1</sup>, Микола М. Голобородько<sup>1</sup>, Кирило В. М'ясоєдов<sup>1</sup>, Михайло В. Книгін<sup>1</sup>, Віталій С. Страховецький<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Харківський державний медичний університет, м. Харків, Україна

<sup>2</sup>Інститут клітинної біореабілітації, м. Харків, Україна

<sup>3</sup>Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, м. Харків, Україна

### Резюме

**Мета.** Дослідити адгезивні властивості і здатність до утворення мікробних біоплівки збудників синдрому діабетичної стопи окремо і в асоціаціях та порівняти їх з референтними штамми.

**Матеріали та методи.** Матеріалом для дослідження був вміст з ран нижніх кінцівок у 41 хворого на ішемічну та змішану форми синдрому діабетичної стопи, з якого виділяли чисті культури мікроорганізмів. Адгезивні властивості виділених збудників визначали за показниками середнього показника адгезії, коефіцієнта участі еритроцитів та індексу адгезивності мікроорганізмів. Здатність до формування біоплівки оцінювали після їх формування *in vitro* через визначення оптичної щільності. Вивчали характеристики як ізольованих виділених штамів, так і двох- та трьохкомпонентних мікробних асоціацій. Отримані результати порівнювали з відповідними показниками референтних штамів.

**Результати.** Високоадгезивні властивості за визначеними показниками мали всі виділені з ран пацієнтів патогенні мікроорганізми, а низькоадгезивні та середньоадгезивні – їх референтні штами. Двох- та трьохкомпонентні ізоляти також продемонстрували достовірно суттєво вищу адгезивність у порівнянні з референтними штамми. Найвищі показники середньої оптичної щільності мікробних біоплівки мали високоадгезивні штами *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* і *Klebsiella pneumoniae*. Оптична щільність мікробних біоплівки, сформованих сумішшю ізолятів виділених штамів *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans*, виявилася достовірно вищою, ніж у референтних штамів та кожного виду мікроорганізму окремо.

### Висновки.

1. Одну з ключових ролей в патогенезі синдрому діабетичної стопи відіграє мікрофлора, здатна утворювати мікробні біоплівки.
2. Мікроорганізми, виділені з хронічних ран при синдромі діабетичної стопи, мають достовірно більші адгезивні властивості та здатність до утворення біоплівки, що також вказує на їх підвищену вірулентність у порівнянні із відповідними референтними штамми.
3. Мікробні біоплівки, утворені асоціацією виділених штамів *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans*, відрізняються вищою оптичною щільністю від таких, що були утворені їх референтними штамми окремо та в асоціації. Таким чином, мікробні асоціації патогенів при синдромі діабетичної стопи також можуть мати підвищену вірулентність у порівнянні з їх чистими культурами.

**Ключові слова:** діабетична стопа, хронічні рани, мікробні біоплівки, адгезивні властивості

### ВСТУП

Хронічними називають рани, що не загоюються впродовж 3 місяців, незважаючи на дотримання рекомендованих методів лікування [16]. Клінічною характеристикою хронічних ран є відсутність зміни природних стадій загоєння. Еволюція їх затримується

в стані стійкого патологічного запалення, інфекції і некрозу, що перешкоджає регульованим часом процесам загоєння, збільшує пошкодження тканин і гальмує відновлення [4].

Хронічні рани нижніх кінцівок є серйозною клінічною проблемою та призводять до тривалих

страждань не тільки самих пацієнтів, а й їх сімей. Головними причинами їх виникнення є цукровий діабет, судинна недостатність (артеріальна або венозна) та пролежні [4]. Вказана патологія, незалежно від причини, вражає 1-6% населення та забирає до 6% від асигнувань на медицину в цілому, причому частота випадків має чітку тенденцію до зростання [10]. Хронічні рани – не тільки локальна косметична проблема, вони систематично призводять до інвалідності та стійко асоціюються з підвищеною летальністю серед цієї категорії пацієнтів. Так, хронічні рани переважно діабетичної етіології передують ампутації кінцівок в 80-85% випадків, а 5-річний термін після ампутації переживають тільки 50-60% пацієнтів [4, 10, 17]. Незважаючи на різне походження, такі рани мають низку спільних особливостей: подовжена та/або посилена фаза запалення, хронізація інфекції, відсутність реакції клітин на репаративну стимуляцію та формування резистентних мікробних біоплівки [9].

Термін «мікробна біоплівка» був вперше використаний в медичній літературі більше 35 років тому [7]. На теперішній час вже достовірно встановлено, що і в природних умовах, і в організмі людини і тварин, і в умовах лабораторій або виробництв більшість мікроорганізмів існують не як самостійні ізолявані (планктонні) клітини, а у складі біоплівок [6]. Мікробна біоплівка визначається як фіксоване мікробне співтовариство клітин, що незворотно прикріплені до субстрату, поверхні або одне до одного, вбудовані в матрицю з вироблених ними ж позаклітинних полімерних речовин і демонструють змінений фенотип щодо швидкості росту і транскрипції генів [8]. Іншими словами, біоплівки – це жива біомаса, яка має особливу складну соціальну структуру, функції та властивості.

Клінічне значення мікробних біоплівок взагалі важко переоцінити, адже за даними Національного інституту здоров'я США, вони визначаються не менш ніж у 80% випадках бактеріальних інфекцій людини [21], а здатність утворювати мікробні біоплівки присутня у 40-80% відомих бактерій [3]. Суттєвий негативний вплив на репаративні процеси мікробні біоплівки мають і при синдромі діабетичної стопи. Наявність біоплівок в хронічних ранах відзначається в 60-80% випадків на відміну від 6% – при гострих випадках [14, 15]. Мікробні біоплівки провокують гіперреактивне запалення та гіпоксію тканин, що перешкоджає нормальним процесам загоєння [13].

Біоплівки також сприяють як захисту, так і розширенню колоній [20]. Мікроорганізми у складі біоплівок виявилися дуже стійкими до впливу ультрафіолетового опромінення, дегідратації, вірусів та факторів імунного захисту. Фактором стійкості біоплівок виявляється позаклітинна полімерна субстанція – слизово-полімерний шар,

що виробляється мікроорганізмами одразу після адгезії і містить ліпополісахариди, протеоглікани, глікопротеїди, ендолісахариди, аналогічні речовині клітинної стінки, глікокаліксу та капсул бактерій. Наявність вказаної речовини в десятки разів сповільнює дифузію сторонніх сполучень (в тому числі – антибіотиків та факторів імунітету) з навколишнього середовища всередину мікроорганізмів через біоплівки [8]. Таким чином, резистентність мікробних біоплівок до антибіотиків та антисептиків зростає в 500-1000 разів [11]. На додаток, завдяки щільному міжклітинному контакту в мікробних біоплівках, стимулюється міжклітинна горизонтальна передача генетичних факторів антибіотикорезистентності [22]. Вищенаведене зумовлює неадекватно слабку імунну відповідь та неефективність системної та місцевої протимікробної терапії, що пролонгує загоєння ран з переходом до хронічного або рецидивуючого стану [25].

## МЕТА

Дослідити здатність до утворення біоплівок і адгезивні властивості у збудників синдрому діабетичної стопи окремо та в асоціаціях і порівняти їх з відповідними референтними штамми.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження був вміст з ран нижніх кінцівок у 41 хворого на ішемічну та змішану форми синдрому діабетичної стопи, які проходили лікування у відділенні гострих захворювань магістральних судин ДУ «ІЗНХ ім. В. Т. Зайцева НАМНУ» протягом 2022 року. Всі пацієнти хворіли на ЦД II типу та мали IV ступінь ішемії нижньої кінцівки за Fontaine з локалізацією виразково-некротичних уражень м'яких тканин в межах стопи. Середній вік учасників дослідження становив  $61 \pm 6,3$  роки, Гендерні дані: 24 (58,5%) – чоловіки, 17 (41,5%) – жінки. Тривалість захворювання становила 5-15 років, терміни виникнення ран – від 3 місяців до 1 року. Усі пацієнти підписали інформовану згоду на участь в дослідженні, а Етичний комітет ДУ «ІЗНХ ім. В. Т. Зайцева НАМНУ» схвалив його проведення.

Для взяття матеріалу використовували стандартний паперовий ендодонтичний штафт № 30, який занурювали в край рани на 30 с для сорбції рідкої частини, а потім переносили в пробірку з 0,5 мл напіврідкого транспортного середовища Еймса. Транспортування проводили в термоконтейнерах при температурі  $+6 \pm 2$  °C протягом не більше 4 годин. Отримане з ран мікробне середовище проходило стандартне культивування на 5% кров'яному гемін-агарі протягом 7 діб при 37 °C. Для ідентифікації виділених культур використовували комплекс морфологічних,

культуральних, біохімічних, хемотаксономічних ознак. Визначення видової приналежності чистих культур бактерій проводили з використанням діагностичних наборів API (Франція) та Roche (ФРН).

Здатність до формування біоплівки була вивчена у 19 виділених штамів *Staphylococcus aureus*, 6 штамів *Candida albicans*, 15 штамів *Escherichia coli*, 13 штамів *Klebsiella pneumoniae*, 11 штамів *Pseudomonas aeruginosa* та 8 штамів *Acinetobacter baumannii*. Для порівняння використані референтні штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923-4, *Candida albicans* NCTC 885-653, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70060, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Характеристики кожного штаму вивчалися окремо в 10 постановках з подальшим вирахуванням середнього показника для конкретного виду мікроорганізму.

Кількісну оцінку адгезивної активності проводили відповідно до методу Brilis V. I. та співавторів [5]. Для цього було використано людські еритроцити першої групи, які інкубували з ізолятами виділених збудників та референтних штамів. Для дотримання стандартних умов у постановці експериментів використовували еритроцити одного донора. З інкубату виготовляли мазки за Романовським-Гімзою. При оцінці адгезивних властивостей мікроорганізмів використовували наступні характеристики: коефіцієнт участі еритроцитів – відсоток еритроцитів, які мають на поверхні фіксовані мікроорганізми (у відсотках), середній показник адгезії – середня кількість мікроорганізмів, що прикріпились до одного еритроциту (в одиницях), та індекс адгезивності мікроорганізмів – середня кількість мікробних клітин, фіксованих на одному еритроциті, що бере участь в адгезивному процесі (в одиницях). Показники визначали при дослідженні 50 еритроцитів. Мікроорганізми вважали низькоадгезивними при показнику індексу адгезивності менше за 1,75, середньоадгезивними – при його значенні від 1,75 до 4,00 включно та високоадгезивними – при результаті, більшому за 4,00 одиниці. Мікроскопію здійснювали на дослідницькому стереомікроскопі Leica Microsystems M205C (США) та мікроскопі Invitrogen™ EVOS™ Digital Color Fluorescence Microscope (США).

Біоплівки *in vitro* формували наступним чином. Бактеріальну культуру засівали на скошений агар та інкубували у термостаті 24 години при температурі 37 °С. Змив з агарової культури проводили додаванням 1 мл фізіологічного розчину та доводили до стандарту мутності за Мак Фарландом (McFarland Standard). В лунки стандартного пластикового планшету вносили по 150 мкл поживного середовища (поживний бульйон для *S. aureus* і грамнегативних збудників або середовище Сабуро для *Candida albicans*) та по 10 мкл

культури. Інкубацію проводили при 37 °С 24 години. Вміст лунок відбирали та відмивали фізіологічним розчином. В лунки вносили 150 мкл дистильованої води та 15 мкл 1% спиртового розчину генціанвіолету та інкубували при кімнатній температурі 45 хвилин. Фарбник відбирали та промивали лунки дистильованою водою. В лунки вносили по 250 мкл етилового спирту та інкубували при кімнатній температурі 45 хвилин. Рідину відбирали, планшети висушували, сформовані біоплівки вивчали під мікроскопом та фотографували. Оптичну щільність мікробних біоплівок оцінювали за допомогою апарата Dynex DynaRead Microplate Reader (Велика Британія) в одиницях оптичної щільності при довжині хвилі випромінювання 570 нм.

Усі отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою програмного пакету Statistica v.13.3. Середні показники наведені у вигляді ( $M \pm m$ ), де «M» – середнє значення, а «m» – стандартна похибка середнього. Значущість розбіжностей даних між групами визначали за критерієм Стьюдента. Відмінності між групами вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ

Як свідчать проведені нами дослідження, високоадгезивні властивості за трьома дослідженими показниками мали всі виділені з ран пацієнтів патогенні мікроорганізми, а низькоадгезивні та середньоадгезивні – їх референтні штами. Найбільшими адгезивними властивостями володіли ізоляти *Candida albicans* і неферментуючих грамнегативних збудників – *Pseudomonas aeruginosa* та *Acinetobacter baumannii*. Двох- та трьохкомпонентні суміші ізолятів також продемонстрували достовірно суттєво вищу адгезивність у порівнянні з аналогічними показниками референтних штамів (Табл. 1).

Індекс адгезивності ізолятів *Candida albicans* та *Staphylococcus aureus*, який ми вважаємо інтегральним показником адгезивних властивостей мікроорганізмів, перевищив аналогічний показник референтних штамів в 1,85 та 2,04 рази відповідно. Найвищими показники адгезивних властивостей виявились у асоціацій мікроорганізмів, особливо за участі *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Acinetobacter baumannii*. Індекс адгезивності мікроорганізмів для суміші ізолятів *Candida albicans* і *Staphylococcus aureus* перевищив контрольний показник в 2,10, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* – в 1,91, *Escherichia coli* і *Acinetobacter baumannii* – в 1,81, а *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Candida albicans* – в 1,97 рази.

Усі виділені мікроорганізми продемонстрували здатність до формування біоплівок, що оцінювали за показниками оптичної щільності останніх (Табл. 2).

## Показники адгезивних властивостей ізолятів та референтних штамів досліджуваних збудників

№	Групи досліджуваних штамів	Коефіцієнт участі еритроцитів %	Середній показник адгезії	Індекс адгезивності мікроорганізмів
1	ізоляти <i>Candida albicans</i>	86,18±3,59*	3,63±0,25*	5,72±1,1*
	референтний штам <i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	77,12±2,64	2,25±0,15	3,09±0,15
2	ізоляти <i>Staphylococcus aureus</i>	81,15±1,24*	3,15±0,33*	4,98±1,3*
	референтний штам <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	74,7±6,5	2,05±0,33	2,44±0,54
3	ізоляти <i>Escherichia coli</i>	76,25±1,21*	3,11±0,35*	4,56±1,7*
	референтний штам <i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	70,7±5,5	2,05±0,17	2,66±0,52
4	ізоляти <i>Klebsiella pneumoniae</i>	80,35±1,34*	3,33±0,31*	4,86±1,5*
	референтний штам <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	75,3±5,5	2,05±0,45	2,64±0,62
5	ізоляти <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82,15±1,24*	3,75±0,27*	5,34±1,5*
	референтний штам <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	77,7±3,5	2,25±0,13	3,19±0,13
6	ізоляти <i>Acinetobacter baumannii</i>	82,35±1,36*	3,61±0,25*	5,36±1,7*
	референтний штам <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	75,5±6,3	2,35±0,18	3,11±0,13
7	ізоляти <i>Candida albicans</i> і <i>Staphylococcus aureus</i>	91,31±5,16*	4,15±0,97*	7,17±1,76*
	референтні штами <i>Candida albicans</i> і <i>Staphylococcus aureus</i>	80,23±3,61*	2,88±0,41	3,41±1,24*
8	ізоляти <i>Staphylococcus aureus</i> і <i>Klebsiella pneumoniae</i>	90,31±4,16*	4,25±0,67*	5,64±1,3*
	референтні штами <i>Staphylococcus aureus</i> і <i>Klebsiella pneumoniae</i>	80,63±3,65*	3,22±0,51	2,97±0,15
9	ізоляти <i>Staphylococcus aureus</i> і <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93,35±4,14*	4,27±0,83*	5,72±1,1*
	референтні штами <i>Staphylococcus aureus</i> і <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82,25±2,63	3,18±0,33	2,99±0,15
10	ізоляти <i>Escherichia coli</i> і <i>Klebsiella pneumoniae</i>	88,33±2,61*	3,99±0,67*	5,62±1,7*
	референтні штами <i>Escherichia coli</i> і <i>Klebsiella pneumoniae</i>	80,33±4,63	2,68±0,63	3,09±0,13
11	ізоляти <i>Escherichia coli</i> і <i>Acinetobacter baumannii</i>	92,21±5,36*	4,35±0,17*	5,79±2,1*
	референтні штами <i>Escherichia coli</i> і <i>Acinetobacter baumannii</i>	83,35±5,13	2,98±0,63	3,19±0,17
12	ізоляти <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> і <i>Escherichia coli</i>	93,51±4,16*	4,35±0,11*	5,86±1,7*
	референтні штами <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> і <i>Escherichia coli</i>	82,53±4,91	3,18±0,21	3,05±0,19
13	Ізоляти <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Candida albicans</i>	93,13±4,19*	4,55±0,83*	6,22±1,5*
	референтні штами <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Candida albicans</i>	81,75±5,33	2,98±0,53	3,15±0,17

\* – різниця між відповідним виділенням та референтним штамом достовірна (p<0,05).

За даними проведеного дослідження також встановлено достовірну різницю між досліджуваними та референтними штамми за показником оптичної щільності сформованих ними мікробних біоплівки (p<0,001). Найвищі показники середньої оптичної щільності мікробних біоплівки мали високоадгезивні штами *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, а також *Klebsiella pneumoniae* і середньоадгезивні штами *Candida albicans*.

Враховуючи те, що перебіг ранового процесу у хворих на ЦД часто пов'язаний з інфікуванням мікробними асоціаціями, в якості прикладу нами було вивчено консорціум, утворений *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans*, як один з найбільш

клінічно значущих варіантів взаємодії патогенної мікрофлори людини [23]. Були сформовані двохкомпонентні мікробні біоплівки з 6 ізолятів *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans*, для контролю використані референтні штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Candida albicans* ATCC 885 (Табл. 3).

За результатами дослідження, оптична щільність мікробних біоплівки, сформованих сумішшю ізолятів виділених штамів *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans* виявилася достовірно в 1,21-1,27 рази вищою, ніж у референтних штамів та в 1,28-1,36 рази вищою, ніж у випадку її формування кожним видом мікроорганізму окремо.

Таблиця 2

## Показники середньої оптичної щільності біоплівки, що були сформовані досліджуваними збудниками

№	Досліджувані штами	Оптична щільність біоплівки, одиниці оптичної щільності
1	ізоляти <i>Staphylococcus aureus</i>	0,0642±0,0025*
2	референтний штам <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,0450±0,0048
3	ізоляти <i>Escherichia coli</i>	0,0540±0,0093*
4	референтний штам <i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	0,0430±0,0062
5	ізоляти <i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,0688±0,0069*
6	референтний штам <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	0,0460±0,0022
7	ізоляти <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,0765±0,0084**
8	референтний штам <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,0460±0,0048
9	ізоляти <i>Acinetobacter baumannii</i>	0,0763±0,0068**
10	референтний штам <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	0,0460±0,0036
11	ізоляти <i>Candida albicans</i>	0,0680±0,0044*
12	референтний штам <i>Candida albicans</i> NCTC 885-653	0,0550±0,0027

\* – різниця між відповідним виділенням та референтним штамом достовірна (p<0,05);

\*\* – різниця між відповідним виділенням та референтним штамом достовірна (p<0,01).

Таблиця 3

Показники середньої оптичної щільності біоплівки, що сформовані штамами *Staphylococcus aureus*/*Candida albicans*

Ідентифікатори досліджуваних штамів <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Candida albicans</i>	Оптична щільність біоплівки, одиниці оптичної щільності
678/1033	0,0921±0,0055*
617/1098	0,0876±0,0061*
661/1034	0,0903±0,0039*
845/1212	0,0900±0,0052*
1/1050	0,0885±0,0028 *
4/1098	0,0881±0,0045 *
ATCC 25923/ATCC 885	0,0724±0,0036

\* – різниця між виділеннями та референтним штамом достовірна (p<0,05).

## ОБГОВОРЕННЯ

Однією з основних умов успішного лікування хворих з синдромом діабетичної стопи є подолання хронічної інфекції в рані. При цьому, боротьбу доводиться вести не з окремими планктонними штамами мікробних патогенів, а зі сформованими ними складними та багатокомпонентними біоплівками, що радикально змінюють базові властивості мікробних співтовариств [1]. Формування ж самої мікробної біоплівки проходить наступних 4 етапи: 1) адгезія мікроорганізмів до будь-якого субстрату (складається із зворотної та незворотної фази); 2) формування мікроколоній, 3) зростання та дозрівання колонії, синтез ЕПС; 4) від'єднання колонії та/або дисперсія планктонних мікроорганізмів [25]. Здатність мікроорганізмів до формування біоплівки вже зараз обґрунтовано розглядається як незалежний фактор вірулентності [19]. Адгезивні властивості мікроорганізмів також мають позитивну кореляцію з їх вірулентністю [2, 18], оскільки початком формування біоплівки є саме фіксація мікроорганізмів до певного субстрату.

З огляду на вищенаведене, наразі проводяться чисельні дослідження, скеровані на вивчення процесів утворення, життєдіяльності та властивостей мікробних біоплівки. З цією метою використовуються найрізноманітніші речовини та технології. Фізичні (ультразвук, холодна плазма, іонізуюче та ультрафіолетове випромінювання) та хімічні методи почали використовуватись першими, але більш перспективними вважаються нано- та біотехнології (антимікробні пептиди, наноматеріали, інгібітори специфічних факторів росту біоплівки та обміну генетичною інформацією, бактеріофаги, інгібітори регулювання росту колоній та експресії певних генів, ензими, пептиди нуклеїнових кислот) [25]. Разом з тим, переважна більшість згаданих методик та напрямків боротьби з біоплівками зараз існує в межах відповідних досліджень, що тривають або не пройшли клінічних випробувань.

На поточний час відомі клінічні рекомендації з діагностики та лікування інфекцій, асоційованих з мікробними біоплівками від Європейського Суспільства Клінічної Мікробіології та Інфекційних Захворювань, які були видані у 2014 році і з вказаного часу не оновлювалися [12]. Автори надають переважно загальну інформацію з приводу

діагностики та лікування вказаних інфекцій, й, зокрема, наголошують на відсутності достатнього обсягу систематичних клінічних досліджень для можливості обґрунтованого застосування певних методів лікування хронічних ран та нагальній необхідності подальших розробок нових антибіотиків, методів та засобів зниження вірулентності флори та протидії біоплівкам на всіх етапах їх існування.

Таким чином, отримання можливості запобігати утворенню мікробних біоплівок та/або пригнічувати (руйнувати) ті, що вже сформувалися, розглядається як один з найперспективніших напрямків в лікуванні не тільки синдрому діабетичної стопи, а й інших інфекцій, асоційованих з мікробними біоплівками [24, 25].

### ВИСНОВКИ

1. Одну з ключових ролей в патогенезі синдрому діабетичної стопи відіграє мікрофлора, здатна утворювати мікробні біоплівки.

2. Мікроорганізми, виділені з хронічних ран при синдромі діабетичної стопи, мають достовірно більші адгезивні властивості та здатність до утворення біоплівок, що також вказує на їх підвищену вірулентність у порівнянні із відповідними референтними штамми.

3. Мікробні біоплівки, утворені асоціацією виділених штамів *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans*, відрізняються вищою оптичною щільністю від таких, що були утворені їх референтними штамми окремо та в асоціації. Таким чином, мікробні асоціації патогенів при синдромі діабетичної стопи також можуть мати підвищену вірулентність у порівнянні з їх чистими культурами.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримана в ході наведеного дослідження інформація частково пояснює причини незадовільних результатів лікування хворих з синдромом діабетичної стопи, на підставі цього можна дійти висновку про необхідність подальшого вивчення властивостей мікрофлори, що здатна утворювати біоплівки, пошуку ефективних механізмів протидії мікробним біоплівкам і формулювання клінічних рекомендацій з лікування вказаних інфекцій.

### ДОТРИМАННЯ ЕТИЧНИХ НОРМ

Дослідження проводилось з дотриманням принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень із залученням людини як об'єкта дослідження» (2000). Всі пацієнти дали письмову інформовану згоду на збір та обробку клінічного матеріалу. Інформацію вносили в базу даних для подальшого аналізу в анонімізованій формі.

### ФІНАНСУВАННЯ ТА КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Дослідження не має зовнішніх джерел фінансування. Конфлікт інтересів відсутній.

### ВНЕСОК АВТОРІВ

Іванова Ю. В.<sup>A, C, D, F</sup>  
 Граматюк С. М.<sup>B, C, F</sup>  
 Криворучко І. А.<sup>A, C, F</sup>  
 Голобородько М. М.<sup>C, D, E</sup>  
 Страховецький В. С.<sup>C, D, E</sup>  
 М'ясоєдов К. В.<sup>B</sup>  
 Книгін М. В.<sup>B</sup>

### REFERENCES

- Afonso, A. C., Oliveira, D., Saavedra, M. J., Borges, A., & Simões, M. (2021). Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Impact, Risk Factors and Control Strategies. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8278. <https://doi.org/10.3390/ijms22158278>
- Asghar, A., Zahra, A., Kamthan, M., Husain, F. M., Albalawi, T., Zubair, M., Alatawy, R., Abid, M., & Noorani, M. S. (2023). Microbial Biofilms: Applications, Clinical Consequences, and Alternative Therapies. *Microorganisms*, 11(8), 1934. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081934>
- Bamford, N. C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2023). Microbial Primer: An introduction to biofilms – what they are, why they form and their impact on built and natural environments. *Microbiology (Reading, England)*, 169(8), 001338. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001338>
- Bowers, S., & Franco, E. (2020). Chronic Wounds: Evaluation and Management. *American family physician*, 101(3), 159-166.
- Brilis, V. I., Briliene, T. A., Lencner, C. P., Lencner, A.A. (1984). Die adhäsiven Eigenschaften der aus dem Verdauungstrakt des Menschen isolierten Lactobazillen [Adhesive properties of lactobacilli isolated from the human gastrointestinal tract]. *Die Nahrung*, 28(6-7), 635-640. <https://doi.org/10.1002/food.19840280620>
- Chandki, R., Banthia, P., & Banthia, R. (2011). Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 15(2), 111-114. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.84377>
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J.

- (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology*, 41, 435-464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
8. Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
9. Frykberg, R. G., & Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in wound care*, 4(9), 560-582. <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0635>
10. Graves, N., Phillips, C. J., & Harding, K. (2022). A narrative review of the epidemiology and economics of chronic wounds. *The British journal of dermatology*, 187(2), 141-148. <https://doi.org/10.1111/bjd.20692>
11. Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 276-301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
12. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J., Williams, C., & ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21 Suppl 1, S1-S25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>
13. James, G. A., Ge Zhao, A., Usui, M., Underwood, R.A., Nguyen, H., Beyenal, H., deLancey Pulcini, E., Agostinho Hunt, A., Bernstein, H. C., Fleckman, P., Olerud, J., Williamson, K. S., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2016). Microsensor and transcriptomic signatures of oxygen depletion in biofilms associated with chronic wounds. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 24(2), 373-383. <https://doi.org/10.1111/wrr.12401>
14. James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J. W., & Stewart, P. S. (2008). Biofilms in chronic wounds. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 16(1), 37-44. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>
15. Malone, M., Bjarnsholt, T., McBain, A. J., James, G. A., Stoodley, P., Leaper, D., Tachi, M., Schultz, G., Swanson, T., & Wolcott, R. D. (2017). The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of wound care*, 26(1), 20-25. <https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.1.20>
16. Mustoe, T. A., O'Shaughnessy, K., & Kloeters, O. (2006). Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7 Suppl), 35S-41S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225431.63010.1b>
17. Olsson, M., Järbrink, K., Divakar, U., Bajpai, R., Upton, Z., Schmidtchen, A., & Car, J. (2019). The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 27(1), 114-125. <https://doi.org/10.1111/wrr.12683>
18. Pircalabioru, G. G., & Chifiriuc, M. C. (2020). Nanoparticulate drug-delivery systems for fighting microbial biofilms: from bench to bedside. *Future microbiology*, 15, 679-698. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0251>
19. Ponde, N. O., Lortal, L., Ramage, G., Naglik, J. R., & Richardson, J. P. (2021). *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Critical reviews in microbiology*, 47(1), 91-111. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>
20. Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature reviews. Microbiology*, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
21. Sen, C. K., Roy, S., Mathew-Steiner, S. S., & Gordillo, G. M. (2021). Biofilm Management in Wound Care. *Plastic and reconstructive surgery*, 148(2), 275e-288e. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000008142>
22. Stalder, T., Cornwell, B., Lacroix, J., Kohler, B., Dixon, S., Yano, H., Kerr, B., Forney, L. J., & Top, E. M. (2020). Evolving Populations in Biofilms Contain More Persistent Plasmids. *Molecular biology and evolution*, 37(6), 1563-1576. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa024>
23. Todd, O. A., Peters, B. M. (2019). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Pathogenicity and Polymicrobial Interactions: Lessons beyond Koch's Postulates. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 5(3), 81. <https://doi.org/10.3390/jof5030081>
24. Xiao, Y., Wan, C., Wu, X., Xu, Y., Chen, Y., Rao, L., Wang, B., Shen, L., Han, W., Zhao, H., Shi, J., Zhang, J., Song, Z., & Yu, F. (2024). Novel small-molecule compound YH7 inhibits the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* in a sarX-dependent manner. *mSphere*, 9(1), e0056423. <https://doi.org/10.1128/msphere.00564-23>
25. Zhao, A., Sun, J., & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1137947. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>

## Abstract

### BIOFILM-FORMING MECHANISMS IN DIABETIC FOOT SYNDROME PATHOGENS: ADHESIVE PROPERTIES AND INTERACTION IN ASSOCIATIONS

Yuliia V. Ivanova<sup>1</sup>, Svitlana M. Gramatiuk<sup>2</sup>, Igor A. Kryvoruchko<sup>1</sup>, Mykola M. Goloborodko<sup>1</sup>, Kyrylo V. Miasoiedov<sup>1</sup>, Mykhailo V. Nychin<sup>1</sup>, Vitalii S. Strakhovetskyi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kharkiv national medical university, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of cell biorehabilitation, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

**Aim.** To investigate the adhesive properties and biofilm-forming ability of diabetic foot syndrome pathogens, both individually and in associations, and to compare them with reference strains.

**Materials and methods.** The material for the study was the content of lower extremity wounds in 41 patients presenting ischemic and mixed forms of diabetic foot syndrome which was used for isolation of pure cultures of microorganisms. The adhesive properties of the isolated pathogens were evaluated calculating the average adhesion index, erythrocyte participation coefficient and microbial adhesion index. The biofilm-forming abilities were assessed after biofilm formation *in vitro* by determining the optical density. The characteristics of both isolated strains and two- and three-component microbial associations were studied. The obtained results were compared with the corresponding indicators of the reference strains.

**Results.** All pathogenic microorganisms isolated from patients' wounds had high adhesive properties according to the defined parameters while corresponding reference strains had low and medium adhesive properties. Two- and three-component mixtures of isolates of pathogens demonstrated significantly higher adhesive capabilities compared to the strains. Highly adherent strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* demonstrated the highest optical density of microbial biofilms. The optical density of microbial biofilms formed by a mixture of isolates of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* was also notably higher than formed both by the reference strains and by each microorganism species separately.

#### Conclusions.

1. Biofilm-forming microorganisms play one of the key roles in the pathogenesis of diabetic foot syndrome.
2. Microorganisms isolated from chronic wounds in diabetic foot syndrome have significantly higher adhesive properties and biofilm-forming abilities which predicts their increased virulence compared to the corresponding reference strains.
3. The microbial biofilms formed by the association of the isolated *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* strains demonstrated considerably higher optical density than those formed by their reference strains separately and in association. Thus, microbial associations of pathogens in diabetic foot syndrome may also have increased virulence compared to their pure cultures.

**Keywords:** diabetic foot, chronic wounds, microbial biofilms, adhesive properties

Received: 30.01.2025

Accepted: 9.04.2025