

<https://doi.org/10.33878/2073-7556-2025-24-3-95-105>



Поиск бактериальных биопленок в хронической анальной трещине (описательное исследование с углубленной визуализацией)

Игнатенко М.А.¹, Пономаренко А.А.¹, Журина М.В.², Кострикина Н.А.²,
Жарков Е.Е.¹, Николаев Ю.А.², Мелкумян А.Р.¹

¹ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России (ул. Саляма Адилы, д. 2, г. Москва, 123423, Россия)

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН (пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, г. Москва, 117312, Россия)

РЕЗЮМЕ

ЦЕЛЬ: поиск биопленок и оценка бактериального состава хронической анальной трещины (ХАТ).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ: пациенту А., 40 лет, с диагнозом «хронические задняя и передняя анальные трещины со спазмом сфинктера» была проведена боковая подкожная сфинктеротомия с иссечением ХАТ. Перед операцией у пациента брались мазки из трещин для микробиологических исследований. Иссеченные операционные препараты ХАТ помещались в фиксирующие растворы. Микробиологические исследования, включающие в себя секвенирование генов 16S рРНК и MALDI-ToF масс-спектрометрию выделенных культур, проводились с целью оценки бактериального состава ХАТ. Микроскопические исследования, в которые входили сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) применялись для поиска биопленочного расположения микроорганизмов. Выводы о наличии биопленок делали по результатам сравнения фотографий с достоверными их изображениями, описанными в литературе. **РЕЗУЛЬТАТЫ:** в тканях, формирующих ХАТ, на основе секвенирования генов 16S рРНК выявлено большое разнообразие бактерий (56 родов); масс-спектрометрия мазков выявила лишь *E. coli* и *P. anaerobius* в значимой концентрации. С помощью СЭМ на одном из участков иссеченной ХАТ были обнаружены биопленки, содержащие бактериальные клетки (размером до 2 мкм), погруженные во внеклеточный матрикс; вне трещины подобных структур выявлено не было. При ПЭМ было идентифицировано скопление бактериальных клеток, окруженных внеклеточным полимерным матриксом, что было трактовано как биопленка из грамотрицательных бактерий. Через 7 месяцев у пациента сохранялась незаживающая послеоперационная рана в области ранее иссеченной задней трещины. При повторном посеве были получены *E. coli* и *S. gallolyticus* в значимых концентрациях. Иссечение рубцово-измененных краев раны и назначенное консервативное лечение позволили ране эпителизироваться в течение 3 недель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: полученные результаты указывают на то, что микробные биопленки могут быть локализованы в ХАТ. Для достоверных выводов о биопленочной организации микроорганизмов в ХАТ и их влиянии на патологические и репаративные процессы необходимы дальнейшие исследования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроническая анальная трещина, ХАТ, биопленка, боковая подкожная сфинктеротомия, сканирующая электронная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, 16S рРНК секвенирование, MALDI-ToF масс-спектрометрия

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Игнатенко М.А., Пономаренко А.А., Журина М.В., Кострикина Н.А., Жарков Е.Е., Николаев Ю.А., Мелкумян А.Р. Поиск бактериальных биопленок в хронической анальной трещине (описательное исследование с углубленной визуализацией). *Колопроктология*. 2025; т. 24, № 3, с. 95–105. <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2025-24-3-95-105>

Search for bacterial biofilms in the chronic anal fissure (descriptive study with in-depth visualization)

Maria A. Ignatenko¹, Aleksey A. Ponomarenko¹, Marina V. Zhurina²,
Nadezhda A. Kostrikin², Evgeny E. Zharkov¹, Yuri A. Nikolaev²,
Alina R. Melkumyan¹

¹Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology (Salyama Adilya st., 2, Moscow, 123423, Russia)

²Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences (60 let Oktjabrja pr-t, 7, bld. 2, Moscow, 117312, Russia)

ABSTRACT AIM: to reveal biofilms in chronic anal fissure (CAF) bacterial composition.

PATIENTS AND METHODS: patient A., 40 years old, with chronic posterior and anterior anal fissures with sphincter spasm underwent a lateral subcutaneous sphincterotomy with excision of the CAFs. Before the operation swabs were taken from fissures for microbiology. Removed specimens were placed in fixing solutions. Microbiological studies including 16S rRNA gene sequencing and MALDI-ToF mass spectrometry of isolated cultures were carried out to assess the bacterial composition of CAFs. Microscopic studies which included scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were used to search for the biofilm location of microorganisms. Conclusions about the presence of biofilms were made during the comparison of photographs with reliable images described in the literature. **RESULTS:** a wide variety of bacteria (56 genera) was detected in the tissues forming the CAF based on sequencing of 16S rRNA genes; swab's mass spectrometry revealed only *E. coli* and *P. anaerobius* in significant concentrations. Using SEM on one of the sections of the excised CAF were found biofilms containing bacterial cells immersed in an extracellular matrix (which size was within the limits of 2 microns); similar structures weren't detected outside the CAF. On TEM an accumulation of bacterial cells, surrounded by an extracellular polymer matrix, what was interpreted as a biofilm of gram-negative bacteria, was identified. After 7 months, the patient retained a non-healing postoperative wound in the area of the previously excised posterior fissure. After repeated sowing, *E. coli* and *S. gallolyticus* were obtained in significant concentrations. Excision of the scarred edges of the wound and the prescribed conservative treatment allowed the wound to epithelize within 3 weeks.

CONCLUSION: the results show that microbial biofilms can be localized in the CAF. Further researches are needed for reliable conclusions about biofilm organization in CAF and their effect on pathological and reparative processes.

KEYWORDS: chronic anal fissure, CAF, biofilm, lateral internal sphincterotomy, scanning electron microscopy, SEM, transmission electron microscopy, TEM, 16S rRNA sequencing, MALDI-ToF mass spectrometry

CONFLICT OF INTEREST: the authors declare no conflict of interest

FOR CITATION: Ignatenko M.A., Ponomarenko A.A., Zhurina M.V., Kostrikina N.A., Zharkov E.E., Nikolaev Y.A., Melkumyan A.R. Search for bacterial biofilms in the chronic anal fissure (descriptive study with in-depth visualization). *Koloproktologia*. 2025;24(3):95–105. (in Russ.). <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2025-24-3-95-105>

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ: Игнатенко Мария Андреевна, ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России, ул. Салыма Адиля, д. 2, Москва, 123423, Россия; e-mail: marie_ignatenko@vk.com

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Maria A. Ignatenko, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology, Salyama Adilya st., 2, Moscow, 123423, Russia; e-mail: marie_ignatenko@vk.com

Дата поступления — 17.02.2025
Received — 17.02.2025

После доработки — 21.05.2025
Revised — 21.05.2025

Принято к публикации — 05.08.2025
Accepted for publication — 05.08.2025

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая анальная трещина (ХАТ) представляет собой язвенный дефект анодермы, локализующийся в области «анатомического» анального канала, существующий более 2-х месяцев [1], в связи с чем ХАТ можно расценивать как длительно незаживающую рану.

В длительно незаживающих ранах локализовано большое разнообразие микроорганизмов, в том числе и патогенных, чьи факторы вирулентности и продукты жизнедеятельности приводят к длительному состоянию раны в фазе воспаления, что препятствует эпителизации и заживлению раневого дефекта [2]. При определенных условиях эти микроорганизмы обладают способностью формировать биопленки. По данным систематического обзора и метаанализа, проведенного Malone M. et al. (2017), распространенность биопленок в длительно незаживающих ранах различной этиологии (диабетических язвах стопы, пролежней, незаживающих хирургических и неуточненных хронических ранах), в среднем, составляет 78%, варьируя от 60 до 100% [3].

В исследовании Kozlovskaya et al. (2018), в котором изучалась микрофлора более 100 ХАТ, ни один из противомикробных препаратов не продемонстрировал стопроцентного бактерицидного действия. Авторы связывают резистентность микроорганизмов с тем, что бактерии были защищены матриксом биопленки высокой плотности [4], однако ими применялись лишь культуральные методы диагностики без визуализации микробных биопленок.

Наша гипотеза заключается в том, что микробные биопленки, наряду с планктонными микроорганизмами, могут быть локализованы в ХАТ и препятствовать заживлению раневого дефекта.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Терминология

Под биопленками мы понимаем структурированный микробный консорциум, заключенный в экзополимерный матрикс, защищающий входящие в нее организмы от иммунного ответа хозяина и снижающий

чувствительность к препаратам, направленных на эрадикацию микробов из раны [5–7].

Дизайн исследования

С целью поиска биопленок в ХАТ и оценки спектра бактерий в ней был сформулирован следующий дизайн исследования (Рис. 1). Критерием включения является пациент с ХАТ с подтвержденным спазмом сфинктера без сопутствующей патологии. Перед операцией осуществляется взятие мазков из трещины для дальнейших культуральных микробиологических исследований, после чего выполняется операция в объеме боковой подкожной сфинктеротомии с иссечением трещины. Далее иссеченные ткани, образующие ХАТ, подготавливаются для дальнейших исследований. Для поиска биопленок микроорганизмов используется сканирующая электронная и просвечивающая электронная микроскопии. Для оценки микробиома ХАТ применяется 16S rPHK секвенирование и MALDI-ToF масс-спектрометрия.

Характеристика клинического наблюдения

Пациент А., 40 лет, обратился в поликлинику ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России с жалобами на боли в области заднего прохода во время и после дефекации, периодические выделения крови. Указанные симптомы беспокоили больного в течение года; консервативные методы лечения эффекта не дали. При осмотре анального канала на 6 и 12 часах по условному циферблату визуализировались хронические дефекты анодермы. В ходе обследования пациент испытывал резкую боль. На основании анамнеза, объективного осмотра и профилометрии был установлен диагноз

К.60.1 Хронические задняя и передняя анальные трещины со спазмом сфинктера. Больной был госпитализирован в Центр, и была выполнена операция в объеме боковой подкожной сфинктеротомии с иссечением 2-х трещин.

Подготовка образцов

Перед проведением операции были взяты мазки из 2-х ХАТ для дальнейшей идентификации аэробных и анаэробных бактерий, локализующихся в них. После иссечения трещин образцы тканей фиксировались на булавках и помещались в растворы для дальнейшей транспортировки и хранения. Образцы передней ХАТ были взяты для просвечивающей электронной микроскопии, задней — для 16SpPHK секвенирования и сканирующей электронной микроскопии.

MALDI-ToF масс-спектрометрия

Для видовой идентификации выделенных микроорганизмов использовали изолированные колонии, полученные при первичном росте на плотных питательных средах. Бактериальные культуры подвергали предварительной пробоподготовке (экстракции) и использовали метод прямого нанесения материала на мишень масс-спектрометра. После нанесения культуры на 2 ячейки стальной мишени, добавляли 1 мкл 70% муравьиной кислоты, высушивали на воздухе и сверху наносили 1 мкл матрицы, состоящей из α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (α -CHCA) и 50,0% ацетонитрила / 2,5% трифторуксусной кислоты (ООО НПФ «Литех»). После высыхания матрицы мишень помещали во времяпролетный масс-спектрометр Microflex (Bruker Daltonics, Germany). Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс

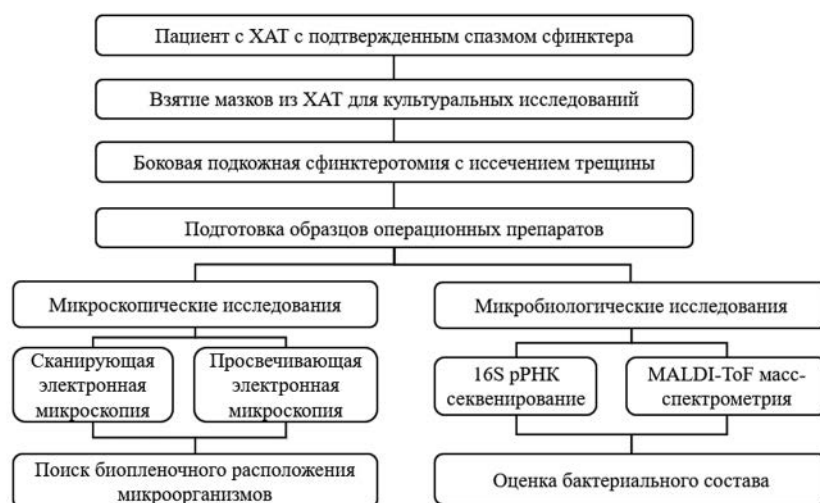


Рисунок 1. Дизайн исследования

Figure 1. Research design

хорошо охарактеризованных смесей лиофилизированных белков *E. coli*. Идентификация микроорганизмов и расчет коэффициента достоверности (КД) проводились в автоматическом режиме; для каждого результата приводилась ссылка на NCBI (National Center for Biotechnology Information). КД $\geq 2,0$ свидетельствовал об идентификации с точностью до вида; 1,7–2,0 — до рода; $< 1,7$ — отрицательной.

16SpPHK секвенирование

ДНК выделяли с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Germany), руководствуясь протоколами производителя. Вариабельный V3-V4 регион гена 16S rPHK амплифицировали с использованием универсальных праймеров 341F CCTAYGGGDBGCWSCAG и 806R GGACTACNVGGGTHCTAAT [8]. Полученные ПЦР фрагменты использовали для приготовления библиотек для последующего секвенирования с помощью наборов Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina), руководствуясь протоколами производителя. Мультиплексирование осуществлялось с применением наборов Nextera XT Index Kit v. 2. Секвенирование ПЦР фрагментов проводилось с использованием Illumina MiSeq. Было проведено объединение чтений, исключение низкокачественных прочтений, синглетонов и химер. Далее была проведена кластеризация чтений, оставшихся после этих процедур, в ОТЕ с минимальной идентичностью в 97%. С целью определения доли ОТЕ в каждом из образцов, на репрезентативные последовательности ОТЕ проводилось наложение исходных чтений (включая низкокачественные и синглетоны) с минимальной идентичностью в 97% на всей длине чтения. Данные процедуры были выполнены с применением пакета программ usearch [9]. По полученным последовательностям генов 16SpPHK секвенирования была проведена таксономическая идентификация микроорганизмов с использованием usearch и базы данных Silva.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Для СЭМ образцы фиксировали в 2,5%-м растворе глутарового альдегида и дважды промывали натрий-фосфатным буфером, после чего последовательно обрабатывали этанолом в повышающихся концентрациях: 30% (в течение 1–2 мин.), 50% (5–10 мин.), 70% (5 мин.) и 96% (5 мин.). Образцы прикрепляли к колонкам для сканирующей микроскопии (микроскоп JEOL-IT 200, Токуо, Япон) двусторонним скотчем и покрывали золотым напылением.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Образец сразу помещали в 2,5% раствор глутарового альдегида в какодилатном буфере (0,05 М раствор какодилата натрия, pH 7,0–7,5) и выдерживали в течение

суток при 4 °C; затем трижды промывали тем же буферным раствором в течение 5 минут и фиксировали в растворе 1% OsO₄ в 0,05М какодилатном буфере. После фиксации в OsO₄ образцы нарезали на кусочки приблизительно 1,5 на 1,5 мм. Последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата и в 30% этиловом спирте в течение 2 ч., далее в 70% этаноле в течение 12 ч. при 4 °C. Материал обезвоживали в 96% этиловом спирте (2 раза по 10 мин.), затем в абсолютном ацетоне (3 раза по 10 мин.). Образцы заливали в смолу Epon 812 (Epoxy Embedding Medium Epon® 812, Sigma-Aldrich, USA), выдерживали в смеси — смола:ацетон в соотношении 1:1 в течение 2 ч., а затем меняли соотношение смеси на 2:1 и выдерживали в течение еще 2 ч. Обезвоженный материал помещали в капсулы со смолой и выдерживали при температуре 37 °C в течение 24 ч. для пропитки, затем при 60 °C в течение 24 ч. для полимеризации. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (LKB, Sweden), контрастировали в растворе 3% уранилацетата, затем по методу Рейнольдса [10].

Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM100CXП (JEOL, Japan). Фотодокументирование материалов проводили с помощью цифровой системы вывода оптических изображений MoradaG2.

Заключение о наличии биоплёнок делали на основе сравнения фотоизображений с достоверными изображениями биоплёнок, описанных в литературе [11–15].

Таксономические деревья

С целью визуализации иерархии выделенных микроорганизмов при 16SpPHK секвенировании от рода до царства были построены таксономические деревья в RStudio (Rv. 4.3.2 (RFoundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)), используя библиотеку yatahv. 1.0.0. По списку идентифицированных родов микробов была проведена их полная классификация из базы данных NCBI с применением библиотеки Rtaxize v. 0.9.100. В случае, если не получалось провести автоматическую классификацию, поиск велся вручную в NCBI или в регистре SeqCode. Если не удавалось и в этом случае определить 1 из уровней иерархии, оставляли пропуски.

РЕЗУЛЬТАТЫ

MALDI-ToF масс-спектрометрия

При MALDI-ToF масс-спектрометрии из мазков, взятых с передней трещины, была идентифицирована *E. coli* в концентрации 10⁴ КОЕ/мл; из задней также *E. coli*, но в большей концентрации

(10⁸ КОЕ/мл), и *Peptostreptococcus anaerobius* (10⁷ КОЕ/мл). Результаты представлены в табл. 1.

16S рРНК секвенирование

По результатам прочтений последовательностей генов, полученных в ходе 16SpРНК секвенирования, была проведена идентификация бактерий. Часть удалось успешно классифицировать до рода, другие до уровня семейства, порядка, класса, либо лишь типа. Самым распространенным типом оказались Bacillota (47,0%), Pseudomonadota (18,0%), Bacteriodota (12,0%), остальные типы на уровне 12,2%, неклассифицированные 10,7%. Превалирующим классом были Erysipelotrichia (37,9%), Gammaproteobacteria (16,9%), Bacteroidia (11,8%), Bacilli (6,4%), другие классы составили 15,6%, без успешной идентификации — 11,4%. На уровне порядка преобладающими были Peptostreptococcales и Tissierellales (34,8%), Bacteroidales (11,1%), Pseudomonadales (9,7%), Lactobacillales (5,9%), иные порядки (26,3%), неклассифицированные (12,2%). По семействам: Peptostreptococcaceae (33,9%), Prevotellaceae (9,0%), Pseudomonadota (8,1%), Streptococcaceae (5,9%), остальные (29,6%), не удалось классифицировать 13,6%. На уровне рода: Peptostreptococcus (11,2%),

Таблица 1. Бактериальный спектр микроорганизмов, полученных в результате MALDI-ToF масс-спектрометрии мазков, взятых с передней и задней ХАТ.

Table 1. Bacterial spectrum of microorganisms obtained as a result of MALDI-ToF mass spectrometry of smears taken from the anterior and posterior CAF.

Наименование микроорганизма	Концентрация (КОЕ/мл)
Передняя трещина	
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁴
Задняя трещина	
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁸
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	10 ⁷

Pseudomonas (8,1%), *Finnegoldia* (8,1%), *Peptoniphilus* (6,6%), *Prevotella* (6,1%); других родов было 38%, неидентифицированных 22%.

По 56 успешно идентифицированным бактериям до уровня рода было построено таксономическое дерево, представленное на рис. 2.

Кроме этого, были также определены 2 рода, относящиеся к археям: *Woesearchaeales* и *A-plasma*.

Стоит отметить, что в результате микробного профилирования, были определены все бактерии, содержащиеся в биоптате, часть из которых могла быть не ассоциирована с патологическим процессом.

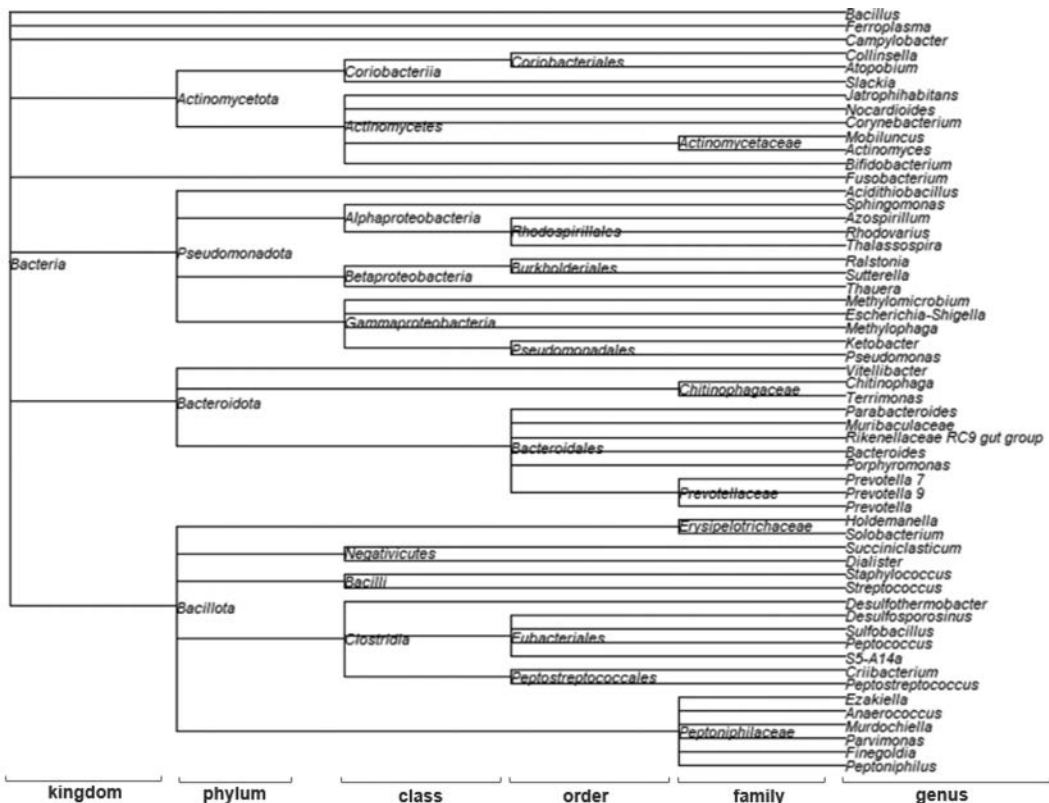


Рисунок 2. Таксономическое дерево, составленное по идентифицированным родам бактерий после 16S рРНК-секвенирования образца иссеченной передней ХАТ

Figure 2. A taxonomic tree drawn from identified bacterial genera after 16S rRNA sequencing of a sample of excised anterior CAF

СЭМ

При анализе изображений, полученных по результатам сканирующей электронной микроскопии, сравнивали участки как в самой ХАТ, так и вне её.

За пределами трещины визуализировалась равномерная поверхность, идентифицируемая как ткань анального сфинктера (Рис. 3а). Объекты, похожие на бактериальные клетки, обнаружены не были.

Похожая картина наблюдалась и на большей части поверхности иссеченной ХАТ, и только на одном участке были обнаружены образования, похожие на биопленки, характеризующиеся наличием отдельных бактериальных клеток размером до 2 мкм, погружённые во внеклеточный полимерный

матрикс, о чём судили по его слизистой природе (Рис. 3б).

ПЭМ

При изучении фотографий образцов иссеченной ХАТ, полученных по результатам просвечивающей электронной микроскопии, также были обнаружены объекты, которые по морфологическим признакам были идентифицированы как биопленки (Рис. 4–5).

Внутри ткани обнаружено образование из клеток (Рис. 4) размером 0,2–0,6 мкм, что соответствует размеру мелких бактериальных клеток. Клетки имеют округлую форму и являются клетками грамотрицательного типа, т. к. состоят только из электронно-плотной

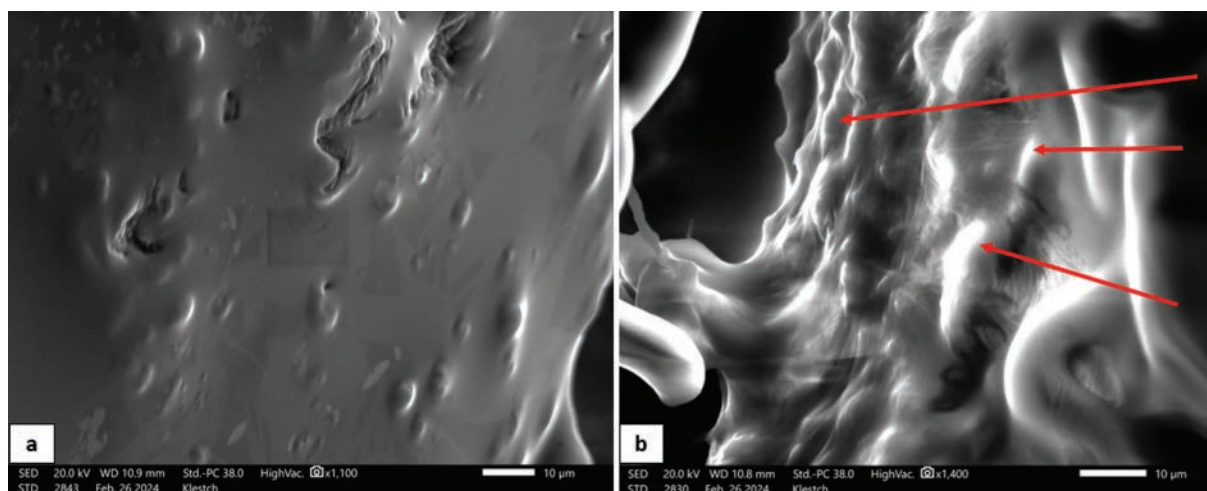


Рисунок 3. Изображения, полученные по результатам СЭМ (масштабная линейка 10 мкм). а) Поверхность ткани внутреннего анального сфинктера; б) поверхность иссеченной ХАТ. Стрелками указаны структуры, идентифицируемые как биопленки

Figure 3. Images obtained from SEM results (scale bar 10 mm). а) The surface of the internal anal sphincter tissue; б) the surface of the excised CAF. The arrows point on structures which were identified as biofilms

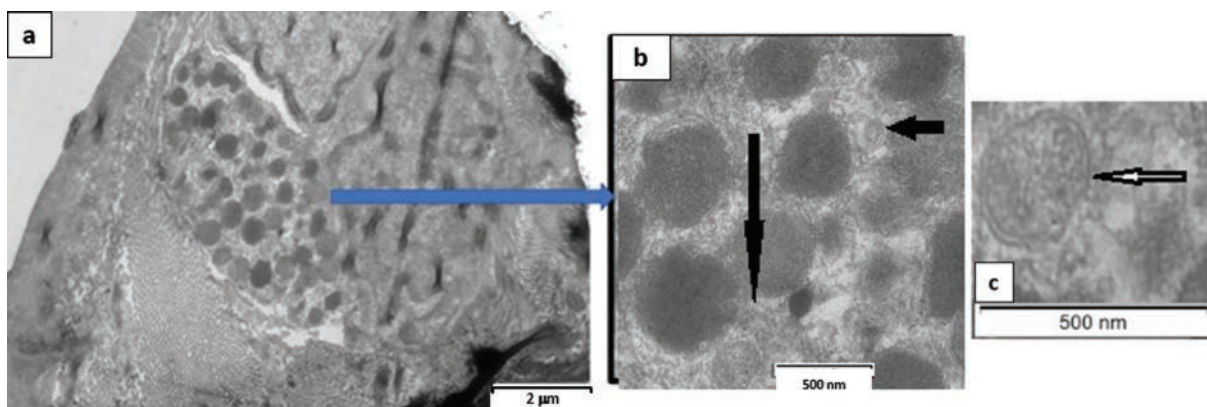


Рисунок 4. Изображение, полученное по результатам ПЭМ. Микробная биопленка, представленная скоплением бактериальных клеток: а) общий вид биопленки (масштабная линейка 2 мкм); б) увеличенное изображение а (масштабная линейка 500 нм), мембранные везикулы показаны стрелками; в) двуслойная клеточная стенка показана стрелкой (увеличенное изображение а (масштабная линейка 500 нм))

Figure 4. The image obtained from the results of TEM. Microbial biofilm represented by a cluster of bacterial cells: а) general view of the biofilm (scale bar 2 mm); б) enlarged image а (scale bar 500 nm), membrane vesicles are shown by arrows; в) a double-layered cell wall is shown by an arrow (enlarged image а (scale bar 500 nm))

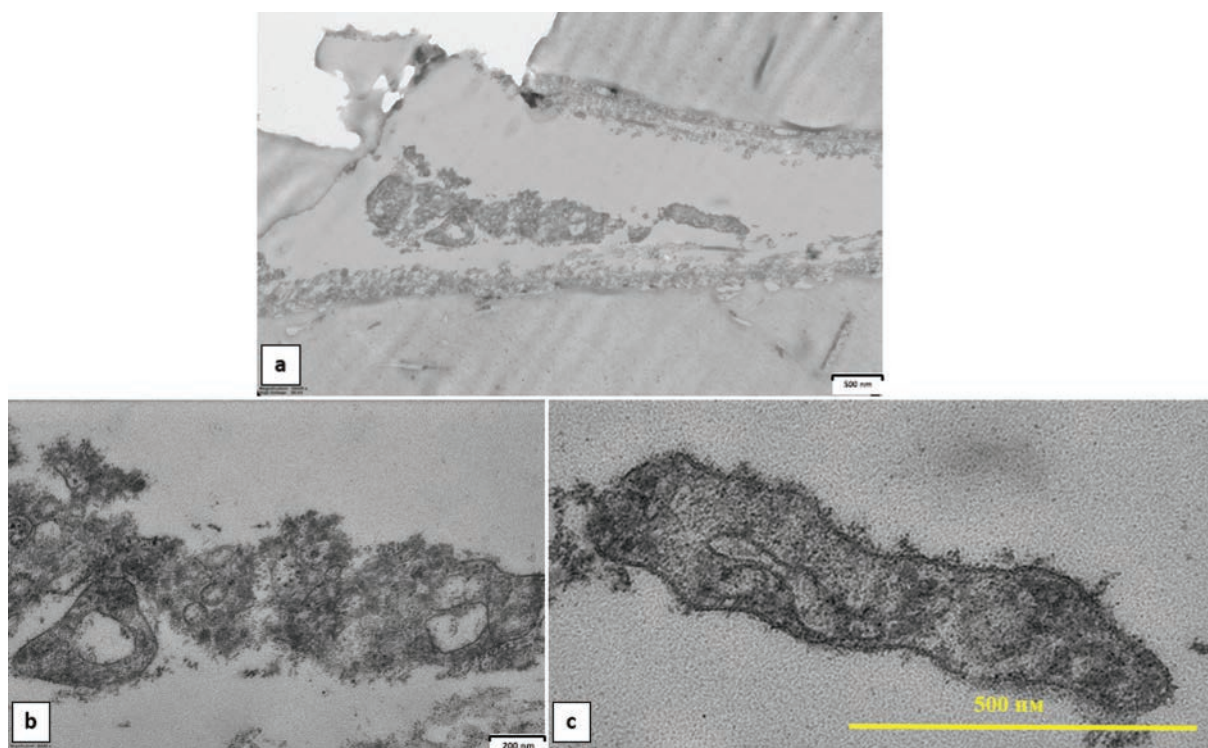


Рисунок 5. Изображения, полученные по результатам ПЭМ. Биопленки в стадии распада. а) масштабная линейка 500 нм; б) масштабная линейка 200 нм; в) масштабная линейка 500 нм

Figure 5. The images obtained from the results of TEM. Biofilms in the decomposition stage. а) 500 nm scale bar; б) 200 nm scale bar; в) 500 nm scale bar

цитоплазмы, окружённой двухслойной клеточной стенкой толщиной 14–20 нм (Рис. 4с). Клетки окружены внеклеточным полимерным матриксом, имеющим чёткую границу. Цитоплазма клеток плотная, детали строения неразличимы, что соответствует некоторым формам покоя [16]. Между клетками также визуализируются мембранные везикулы, характерные для биопленок [17].

На других участках образца ХАТ обнаружены биопленки в стадии распада (дисперсии) (Рис. 5 а,б,в). Окружающая ткань также находится в состоянии разложения (возможно, автолиза). Цитоплазматические мембраны сохранены, а внутриклеточное содержимое отсутствует полностью или частично, внеклеточный матрикс также фрагментирован, внешняя граница биопленки отсутствует. Форма клеток варьирует от округлой до вытянутой, длина составляет от 150 до 1000 нм. Толщина и структура цитоплазматической мембраны соответствуют бактериальной. В некоторых клетках наблюдаются мембранные структуры. На некоторых участках биоптата обнаружены биопленки в стадии распада, состоящие из целых и лизированных L-форм (Рис. 6).

Помимо этого, на многих фотографиях образцов иссеченной ХАТ визуализировались коллагеновые волокна в продольном (Рис. 7а) и поперечном (Рис. 7б) срезах.

Результаты лечения

Больной А. не проходил контрольные обследования после операции и обратился в Центр лишь через 7 месяцев после нее. На 12 часах рана была эпителизирована, тогда как на 6 часах послеоперационная рана сохранялась и расценивалась как длительно незаживающая. Из ее глубины были взяты мазки на бактериальные посевы, по результатам которых были выявлены *E. coli* в концентрации 10^7 КОЕ/мл и *S. gallolyticus* — 10^8 КОЕ/мл (Табл. 2). Рубцовые

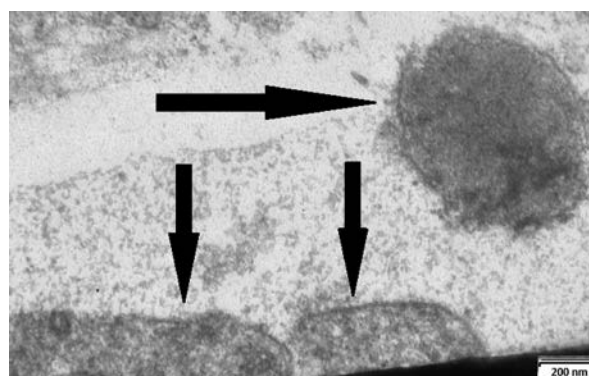


Рисунок 6. Изображение, полученное по результатам ПЭМ. Стрелками указаны L-формы (масштабная линейка 200 нм)

Figure 6. The images obtained from the results of TEM. The arrows indicate L-forms (scale bar 200 nm)

края раны были иссечены, а пациенту назначено консервативное лечение: орнидазол (противопро- тозойный препарат, обладающий активностью и в отношении анаэробных кокков), промывание раны раствором Метрогила (активное вещество: метрони- дазол), нанесение мази Стелланин (стимулирует ре- генерацию тканей) и геля Пронтосана (способствует очищению, увлажнению раны и подавлению бактери- альной флоры). Эпителизация послеоперационной раны наступила через 3 недели после начала лече- ния. Стоит отметить, что манометрические признаки спазма внутреннего анального сфинктера выявлены не были.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящий момент существуют работы, в которых изучалась бактериальная картина острых и храни- ческих анальных трещин, в том числе элиминация микробного составляющего из этой зоны путем при- менения антибактериальных препаратов [4,18–21]. Это говорит о том, что в мире есть исследователи, рас- сматривающие микробный фактор как одну из при- чин длительного незаживления анальной трещины и переход ее в хроническую форму. Существовать бактерии могут как в виде планктонных форм, так и в виде организованных микробных ско- плений — биопленок. Современные представления о существовании микроорганизмов в форме биопле- нок на абиотических поверхностях адекватно про- иллюстрированы в обзоре литературы Sauer K. et al. (Рис. 8) [22], однако ткани человеческого тела более лабильны, и в последнее время появляются работы о биоплёнках на и в тканях человека.

Таблица 2. Бактериальный спектр микроорганизмов, по- лученных в результате MALDI-ToF масс-спектрометрии мазков, взятых из длительно незаживающей послеопера- ционной раны на 6 часах

Table 2. Bacterial spectrum of microorganisms obtained as a result of MALDI-ToF mass spectrometry of smears taken from a long-term non-healing postoperative wound at 6 o'clock

Наименование микроорганизма	Концентрация (КОЕ/мл)
Длительно незаживающая послеоперационная рана на 6 часах	
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁷
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	10 ⁸

Таблица 3. Бактериальные инфекции, ассоциированные с внутриклеточными биопленками у человека [23]

Table 3. Bacterial infections associated with intracellular bio- films in humans [23]

Инфекционное заболевание	Организм
Инфекция мочевыводящих путей (ИМП)	Уропатогенные <i>Escherichia coli</i> (UPEC), <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Инфекции легких (кистозный фиброз)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Средний отит	<i>Haemophilus influenzae</i> и <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Болезнь Альцгеймера	Спирохетальные бактерии
Тонзиллит	Стрептококки группы А

Именно для таких биопленок показано участие в па- тологических процессах. Они найдены как в межкле- точном пространстве, так и внутри клеток человека, что было обобщено в обзоре литературы Mirzaei R. et al. (Табл. 3) [23]. Разница между внутриклеточной и внеклеточной бактериальной биопленкой особенно значительна, поскольку первый вариант обеспечиwa- ет другой уровень защиты как от антибактериальных препаратов, так и от иммунных клеток, что затрудняет их терапию.

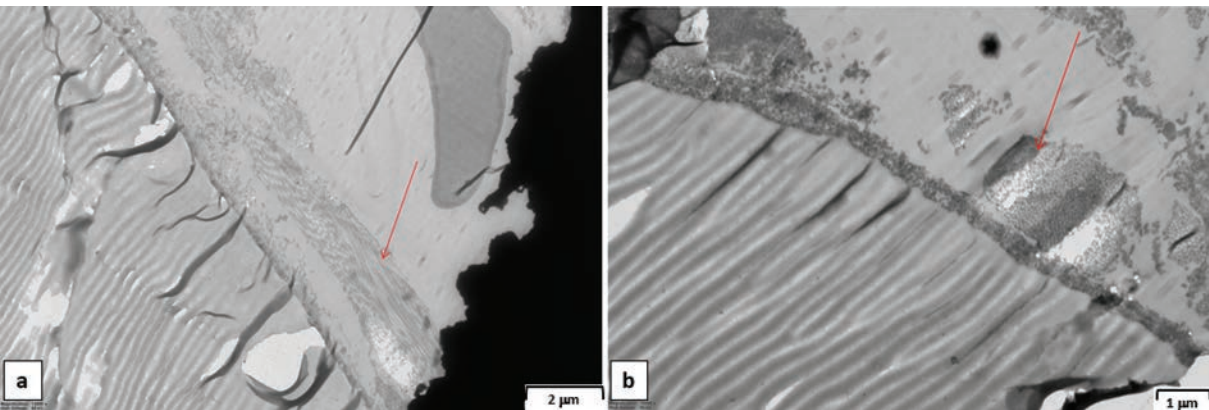


Рисунок 7. Изображения, полученные по результатам ПЭМ. Коллагеновые волокна в а) продольном (масштабная линей- ка 2 мкм) и б) поперечном (масштабная линейка 1 мкм) срезах в образце иссеченной ХАТ. Стрелками указаны коллагено- вые волокна

Figure 7. The images obtained from the results of TEM. Collagen fibers in a) longitudinal (scale bar 2 mm) and b) cross (scale bar 1 mm) sections in the excised CAF. The arrows indicate collagen fibers

Для нашей работы представляют интерес инфекции мочеполовых путей, ассоциированных с *E. coli*, поскольку именно эти микроорганизмы получены по результатам MALDI-ToF масс-спектрометрии, и мы можем предполагать, что в нашем случае механизмы биопленкообразования могут быть схожими.

Поскольку других работ, посвященных микроскопии биопленок анальных трещин, нам не удалось обнаружить, для сравнительного изучения были использованы более изученные биопленки камней мочевого пузыря [11,12], диабетических язв стопы и хронических ран другой этиологии [13–15].

Из работы Worlitzsch D. et al. [24] известно, что на поверхности эпителия клетки патогенов и биопленки могут отсутствовать, зато они могут формироваться в ткани человека под эпителиальными клетками.

Исходя из этих соображений, мы искали клетки микроорганизмов и на поверхности ткани (СЭМ), и в толще ткани (ПЭМ). По результатам СЭМ на поверхности трещины удалось найти клетки только в одной локации (Рис. 3b). Это согласуется с результатами, например, по биопленкам на поверхности кожи [25], на которой есть небольшие их фрагменты, однако представленные в небольшом количестве. Несмотря на то, что образцы для СЭМ подвергаются жесткой обработке с высушиванием, анализ литературы показывает, что найденные образования соответствуют клеткам под слоем матрикса (рис. 4 — в работе Holmberg A. et al. [26] и рис. 3 — в работе Davis L.E. et al. [27]).

На ПЭМ обнаружено больше объектов, похожих на бактериальные клетки. Самая интересная находка — предположительно, биопленка, клетки которой соответствуют *E. Coli* (Рис. 4). Похожая структура была показана в работе Cai Y.M. et al. [28], в которой изучали биопленки патологических легочных процессов. Кроме того, методом ПЭМ обнаружено большое

количество образований, морфологически похожих на формы покоя микроорганизмов, которые авторы наблюдали на других объектах [29].

Стоит обратить внимание на то, что биопленочная организация микроорганизмов препятствует действию антибактериальных веществ, что было показано Kozlovska I. et al. на материалах ХАТ в лабораторных условиях [4], однако в исследовании Grekova N.M. et al. лечение ХАТ суппозиториями с 250 мг метронидазола значительно сокращало сроки заживления, достигая 61% эпителизации на 10 сутки, по сравнению с контрольной группой без АБ терапии (суппозитории с 5 мг гидрокортизона и 5 мг цинхокаина гидрохлорида в течение 14 дней + суппозитории с 250 мг альгината натрия еще на 14 дней), составляющего всего 12,5% [18]. Возможно, в работе Грековой тактика ведения пациентов основной группы позволила разрушить экзополимерный матрикс биопленки и выйти ране из фазы воспаления, либо же микробный фактор действительно играл ведущую роль в патогенезе трещины, но бактерии при этом не были организованы в биопленки, в связи с чем антибиотиками так быстро смогли подействовать и значительно ускорить репаративные процессы. В нашем случае хирургическое снятие спазма внутреннего анального сфинктера позволило эпителизироваться только послеоперационной ране на 12 часах, тогда как на 6 часах спустя 7 месяцев после проведенного лечения рана сохранялась, а из нее были высеяны *E. coli* и *S. gallolyticus* в значимой концентрации. Впоследствии консервативная терапия с применением антибактериальных препаратов способствовала заживлению раны в течение 3 недель. В связи с чем вопрос о роли биопленок в патогенезе ХАТ и возможности их элиминации антибактериальными препаратами требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают на то, что микробные биопленки могут быть локализованы в ХАТ. Для достоверных выводов о биопленочной организации микроорганизмов в ХАТ и их роли в патологических и репаративных процессах необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание №122040800164-6).

УЧАСТИЕ АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования: Игнатенко М.А., Пономаренко А.А., Журина М.В., Николаев Ю.А.

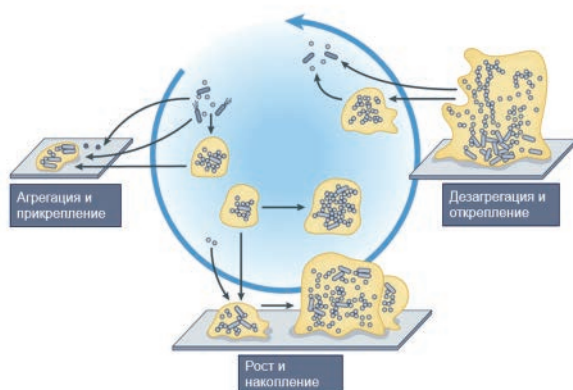


Рисунок 8. Современная модель существования микроорганизмов в формах биопленок и планктонных культур [22]
Figure 8. A modern model of the existence of microorganisms in the forms of biofilms and plankton cultures [22]

Сбор и обработка материалов: Кострикина Н.А., Журина М.В., Пономаренко А.А., Жарков Е.Е., Мелкумян А.Р.

Написание текста: Игнатенко М.А.

Статистическая обработка данных: Игнатенко М.А.

Редактирование: Журина М.В., Пономаренко А.А., Николаев Ю.А., Жарков Е.Е., Мелкумян А.Р.

AUTHORS CONTRIBUTION

Concept and design of the study: Maria A. Ignatenko, Aleksey A. Ponomarenko, Marina V. Zhurina, Yuri A. Nikolaev

Collection and processing of the material: Nadezhda A. Kostrikina, Marina V. Zhurina, Aleksey A. Ponomarenko, Evgeny E. Zharkov, Alina R. Melkumyan

Text writing: Maria A. Ignatenko

Statistical processing: Maria A. Ignatenko

Editing: Marina V. Zhurina, Aleksey A. Ponomarenko, Yuri A. Nikolaev, Evgeny E. Zharkov, Alina R. Melkumyan

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ (ORCID)

Игнатенко Мария Андреевна — специалист отдела планирования и организации научных исследований ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России, ORCID 0009-0005-1182-419X

Пonomarenko Алексей Алексеевич — д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела онкопроктологии, руководитель отдела планирования и организации научных исследований ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России, ORCID 0000-0001-7203-1859

Журина Марина Владимировна — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ORCID 0000-0003-0402-5152

Кострикина Надежда Афанасьевна — старший научный сотрудник подразделения ЦКП «Коллекция UNIQEM» ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ORCID 0000-0001-7510-5593

Жарков Евгений Евгеньевич — к.м.н., старший научный сотрудник отдела общей и реконструктивной колопроктологии ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России, ORCID 0000-0003-3403-9731

Николаев Юрий Александрович — д.б.н., ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией выживаемости микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ORCID 0000-0002-2264-6764

Мелкумян Алина Рантиковна — к.м.н., руководитель отдела изучения микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России, ORCID 0000-0002-5494-415X

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS (ORCID)

Maria A. Ignatenko — 0009-0005-1182-419X

Aleksey A. Ponomarenko — 0000-0001-7203-1859

Marina V. Zhurina — 0000-0003-0402-5152

Nadezhda A. Kostrikina — 0000-0001-7510-5593

Evgeny E. Zharkov — 0000-0003-3403-9731

Yuri A. Nikolaev — 0000-0002-2264-6764

Alina R. Melkumyan — 0000-0002-5494-415X

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Агапов М.А., Алиев Ф.Ш., Ачкасов С.И., и соавт. Клинические рекомендации. Анальная трещина. *Колопроктология*. 2021;20(4):10–21. doi: [10.33878/2073-7556-2021-20-4-10-21](https://doi.org/10.33878/2073-7556-2021-20-4-10-21) / Agapov M.A., Aliev F.Sh., Achkasov S.I., et al. Clinical guidelines. Anal fissure. *Koloproktologia*. 2021;20(4):10–21. (In Russ.). doi: [10.33878/2073-7556-2021-20-4-10-21](https://doi.org/10.33878/2073-7556-2021-20-4-10-21)
2. Canchy L, Kerob D, Demessant A, et al. Wound healing and microbiome, an unexpected relationship. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2023;37(3):7–15. doi: [10.1111/jdv.18854](https://doi.org/10.1111/jdv.18854)
3. Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ, et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a sysPAMatic review and meta-analysis of published data. *Journal of wound care*. 2017;26(1):20–25. doi: [10.12968/jowc.2017.26.1.20](https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.1.20)
4. Kozlovskaya I, Kornaga S, Kykhtyn M, et al. Formation of biofilms by bacteria excreted from chronic anal fissure and the influence of the direct current electric field on them. *Georgian medical news*. 2018;6(279):12–18.
5. Gompelman M, van Asten SAV, Peters EJG. Update on the Role of Infection and Biofilms in Wound Healing: Pathophysiology and Treatment. *Plastic and reconstructive surgery*. 2016;138(3):61s–70s. doi: [10.1097/PRS.0000000000002679](https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002679)

6. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2012;65(2):127–145. doi: [10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x)
7. Lynch AS, Gregory TR. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *Annual Review of Medicine*. 2008;59:415–428. doi: [10.1146/annurev.med.59.110106.132000](https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.132000)
8. Frey B, Rime T, Phillips M, et al. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers. *FEMS Microbiology Ecology*. 2016;92(3):fiw018. doi: [10.1093/femsec/fiw018](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw018)
9. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2460–2461. doi: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461)
10. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*. 1963;17(1):208–212. doi: [10.1083/jcb.17.1.208](https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208)
11. Didenko LV, Tolordava E, Perpanova TS, et al. Electron microscopy investigation of urine stones suggests how to prevent post-operation septic complications in nephrolithiasis. *Journal of Applied Medical Sciences*. 2014;3(4):19–34.
12. Romanova YM, Mulabaev NS, Tolordava ER, et al. Microbial Communities on Kidney Stones. *Molecular Genetics, Microbiology and*

- Virology*. 2015;30(2):74–84. doi: [10.3103/S089141681502007X](https://doi.org/10.3103/S089141681502007X)
13. Oates A, Bowling FL, Boulton AJ, et al. The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. *Journal of diabetes research*. 2014;2014:153586. doi: [10.1155/2014/153586](https://doi.org/10.1155/2014/153586)
14. James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regeneration*. 2008;16(1):37–44. doi: [10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x)
15. Johani K, Malone M, Jensen S, et al. Microscopy visualisation confirms multi-species biofilms are ubiquitous in diabetic foot ulcers. *International wound journal*. 2017;14(6):1160–1169. doi: [10.1111/iwj.12777](https://doi.org/10.1111/iwj.12777)
16. Galuza OA, El'-Registan GI, Kanapatskiy TA, et al. Long-Term Survival of *Enterococcus faecium* under Varied Stabilization and Cell Immobilization Conditions. *Microbiology*. 2024;93(5):615–628. doi: [10.1134/S0026261724606195](https://doi.org/10.1134/S0026261724606195)
17. Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of bacteriology*. 2006;188(16):5945–5957. doi: [10.1128/JB.00257-06](https://doi.org/10.1128/JB.00257-06)
18. Grekova NM, Maleva EA, Lebedeva Y. The effects of topical application of metronidazole for treatment of chronic anal fissure: A randomized, controlled pilot study. *Indian journal of gastroenterology*. 2015;34(2):152–157. doi: [10.1007/s12664-015-0559-2](https://doi.org/10.1007/s12664-015-0559-2)
19. Karapolat B. Could local antibiotics be included in the treatment of acute anal fissure? *Turkish journal of surgery*. 2018;34(4):286–289. doi: [10.5152/turksurg.2018.3988](https://doi.org/10.5152/turksurg.2018.3988)
20. Mert T. The importance of topical metronidazole in the treatment of acute anal fissure: a double-blind study controlled for prospective randomization. *Annals of coloproctology*. 2023;39(2):131–138. doi: [10.3393/ac.2021.00675.0096](https://doi.org/10.3393/ac.2021.00675.0096)
21. Shahid MH, Javed S, Javed S, et al. Comparative Efficacy of Topical Metronidazole and Glyceryl Trinitrate Versus Topical Glyceryl Trinitrate Alone in the Treatment of Acute Anal Fissure. *A Randomized Clinical Trial*. 2022;14(11):e31812. doi: [10.7759/cureus.31812](https://doi.org/10.7759/cureus.31812)
22. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*. 2022;20(10):608–620. doi: [10.1038/s41579-022-00767-0](https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0)
23. Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Sholeh M, et al. The importance of intracellular bacterial biofilm in infectious diseases. *Microbial Pathogenesis*. 2020;147:104393. doi: [10.1016/j.micpath.2020.104393](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104393)
24. Worlitzsch D, R. Tarran, M. Ulrich, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(3):317–325. doi: [10.1172/JCI13870](https://doi.org/10.1172/JCI13870)
25. O'Neill AM, Gallo RL. Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of acne vulgaris. *Microbiome*. 2018;6(1):177. doi: [10.1186/s40168-018-0558-5](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0558-5)
26. Holmberg A, Lood R, Mörgelin M, et al. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009;15:787–795. doi: [10.1111/j.1469-0691.2009.02747.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02747.x)
27. Davis LE, Cook G, Costerton JW. Biofilm on Ventriculo-Peritoneal Shunt Tubing as a Cause of Treatment Failure in Coccidioidal Meningitis. *Emerging Infectious Diseases*. 2002;8(4):376–379. doi: [10.3201/eid0804.010103](https://doi.org/10.3201/eid0804.010103)
28. Cai YM, Zhang YD, Yang L. NO donors and NO delivery methods for controlling biofilms in chronic lung infections. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021;105(10):3931–3954. doi: [10.1007/s00253-021-11274-2](https://doi.org/10.1007/s00253-021-11274-2)
29. Николаев Ю.А., Тихонова Е.Н., Эль-Регистан Г.И., и соавт. Сравнительное исследование состава и структуры микробных биопленок экзониш мясоперерабатывающих комбинатов, различающихся источниками сырья. *Микробиология*. 2022;91(5):613–630. doi: [10.31857/S0026365622600407](https://doi.org/10.31857/S0026365622600407) / Nikolaev Yu.A., Tihonova E.N., El'-Registan G.I., et al. Comparative study of the composition and structure of microbial biofilms of econish meat processing plants with different sources of raw materials. *Microbiologia*. 2022;91(5):613–630. (In Russ.). doi: [10.31857/S0026365622600407](https://doi.org/10.31857/S0026365622600407)