**Михаил Васильев, Сергей Овчинников**

**(Одесса, Украина)**

**МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК**

***PSEUDOMONASAERUGINOSA* В СОСТАВЕ БИОПЛЕНОК**

На пути прогресса антиботикотерапии инфекционных болезней существует несколько серьезных препятствий, одна из которых (наряду с генетической и приобретенной устойчивостью бактерий к антибиотикам) связана с бактериями, находящиеся в биопленке. Концентрации антибиотиков, требуемых для достижения бактерицидного эффекта для микроорганизмов, структурированных в биопленку, в некоторых случаях, в зависимости от природы антибиотика, может быть в 10-100 раз выше, чем для планктонных форм данной бактерии. Стандартное лечение антибиотиками способно уничтожить только планктонные клетки, не затрагивая прикрепленные формы, которые способны выживать в биопленке и размножаться, когда терапия закончена. Кроме того, патогены, живущие в биопленке, взаимодействуют с иммунной системой хозяина. Антигены бактерий биопленки стимулируют синтез антител, но при этом являются устойчивыми к механизмам защиты хозяина [4]. В результате, этот иммунный ответ может повреждать окружающие ткани [5], как, например, при артобстреле повреждаются стенки неприступного сооружения.

Резистентность – это способность микроорганизма расти в присутствии высоких концентраций антибактериального препарата. Чаще всего, клетки биопленки, взятые отдельно от экзополисахаридного матрикса, не более устойчивы, чем планктонные по отношению к широкому диапазону антибактериальных препаратов [9]. Однако в большинстве исследований зарегистрировано выживание клеток в предварительно сформированной биопленке. Более того, возможно, биопленка даже способна расти в их присутствии. Действительно, биопленки очень трудно поддаются уничтожению антибактериальными препаратами. Способность антибактериальных препаратов подавлять рост биопленки означает, что они могут распространяться сквозь ее толщу и активны в отношении своих мишеней, однако при этом клетки в ней не погибают [9].

Существует множество гипотез о механизмах устойчивости бактерий к антимикробным агентам, которая связана с переходом культуры в биопленку; наиболее общепринятыми из них являются следующие.

• **Биопленка как барьер для диффузии антибиотиков**

Естественным препятствием для доступа антибиотиков к клеткам в биопленке является экзополисахаридный матрикс. Долгое время биопленку считали непроницаемым барьером для антибиотиков. Однако в последние годы было доказано проникновение ципрофлоксацина и тобрамицина через модели биопленок *Pseudomonas aeruginosa* на искусственных мембранах. Очевидно, прохождение антибиотиков через биопленку возможно благодаря системе каналов для воды и питательных веществ. При этом авторами отмечалась высокая устойчивость биопленок к данным антибиотикам [8]. Предполагают, что причиной этого может быть способность антибиотиков действовать лишь на небольшое количество метаболически активных клеток, находящихся в зонах с высоким содержанием кислорода. Одним из специфических полисахаридов в биопленках, который может обеспечивать устойчивость к антибиотикам, являются периплазматические глюканы. Хотя они не препятствуют диффузии антибиотиков в биопленке, по данным Mah T. F. et al., глюканы могут связывать тобрамицин и препятствовать его проникновению в клетки [10].

• **Селекция резистентных персистирующих клеток**

Одним из важных механизмов устойчивости к антибиотикам является селекция так называемых «персистирующих клеток». Доказано, что под влиянием субингибирующих концентраций антибиотиков происходит некоторая естественная селекция устойчивых клеток, в результате чего до 10% микробной популяции составляют нечувствительные «клетки-персистеры». Этот механизм не является специфическим для биопленок; более того, при сравнении селекции устойчивых клеток в растущей планктонной культуре, планктонной культуре стационарной фазы и биопленке выявлено, что эффективнее всего этот процесс происходит в культуре стационарной фазы [1].

Причиной этого полагают полное отсутствие роста бактерий в стационарной фазе, даже по сравнению с биопленкой, мишеней для антибиотиков, которыми обычно являются процессы синтеза белка, клеточной стенки или ДНК, происходящие в фазы активного роста. Под спецификой селекции «клеток-персистеров» в биопленке понимают присутствие некоторой части популяции, особенно в зонах с недостаточным доступом кислорода и питательных веществ, в дормантном состоянии, когда все процессы роста замедлены или приостановлены [1].

**• Влияние гетерогенности условий в биопленке**

На формирование рассмотренных выше персистирующих клеток большое влияние оказывает гетерогенность условий, естественным образом возникающая в биопленке. Разница доступа кислорода, питательных веществ, рН в разных слоях биопленки создает условия для одновременного существования клеток как с разной скоростью и направленностью процессов метаболизма, так и находящихся в разных фазах роста. Такая гетерогенность представляет проблему при использовании антибиотика, действующего, например, лишь на фазе активного роста микробных клеток; решением может быть комбинация нескольких антимикробных препаратов разного механизма действия [2].

• **Гипермутабельность в биопленках**

Помимо прочих, одним из источников селекции устойчивых к антибиотикам клеток является гипермутабельность в биопленках. *P. aeruginosa* отличается чрезвычайной мутабельностью. Так, под воздействием сильной антибиотикотерапии количество мутаций в биопленках *P. aeruginosa* может достигать 20 %. Основной причиной мутаций являются повреждения ДНК, часто вызванные оксидативным стрессом (например, под воздействием активных форм кислорода клеток иммунной системы), и нарушения систем репарации у бактерий (в частности, mismatch-репарации). В результате мутаций могут селекционироваться штаммы, устойчивые сразу ко многим антибактериальным препаратам (так называемые MDR – multidrug-resistant strains) [8].

• **Эффлюксные помпы и ферментативная деградация антибиотиков**

Еще одним неспецифическим для биопленок механизмом резистентности являются системы активного выброса (эффлюкс) антибиотика, а также продуктов синтеза самой клетки. У *P. aeruginosa* на сегодня зарегистрировано 5 различных систем эффлюкса; предполагают наличие до 30 таких систем. Одним из продуктов, транспортирующихся через эффлюксные помпы у *P. aeruginosa*, являются β-лактамазы, обеспечивающие устойчивость к антипсевдомонадным пенициллинам [3].

• **Снижение общей вирулентности при формировании биоплёнок**

В экспериментальных условиях часто наблюдается феномен снижения общей продукции факторов вирулентности на этапе размножения и созревания биопленки. Логически это явление обоснованно тем, что до достижения некоторого критического для колонизации всего организма количества возбудителя основную нагрузку будут иметь механизмы маскировки от иммунной системы и размножения клеток. В клинической практике это явление может проявляться как временное исчезновение симптомов после начального курса антибиотикотерапии и переход инфекции в латентную фазу [11].

Клетки *P.aeruginosa* устойчивы к действию многих β-лактамов, аминогликозидов, цефалоспоринов и фторхинолонов.

Инфекции, вызванные *P.аeruginosa* на сегодняшний день излечимы, несмотря на то, что плохо поддаются терапии в связи с множественной её резистентностью, передаваемой R-плазмидами.

Механизмы резистентности *P. aeruginosa*: блокирование транспорта антибиотика к внутриклеточной мишени и инактивация ферментами (β-лактамазы инактивируют пенициллины и цефалоспорины, ацетилтрансфераза и нуклеотидаза инактивируют аминoгликозиды). В исследовании NPRS-3, для синегнойной палочки был характерен высокий уровень резистентности к гентамицину (61,3 %), а также к пиперациллину, пиперациллину/тазобактаму, ципрофлоксацину. Наиболее активными в отношении *P.aeruginosa* являлись амикацин (резистентность 6,7 %) и цефтазидим (резистентность 11,2 %), меропенем (резистентность 3 %) [7].

Возбудитель устойчив к действию антисептиков и дезинфектантов, может сохраняться в растворах фурацилина, способен нейтрализовать некоторые дезинфектанты, чувствителен к высушиванию, хлорсодержащим веществам, высоким температурам и давлению.

Следует отметить, что информация о чувствительности псевдомонад к различным антимикробным агентам касается преимущественно штаммов клинического происхождения, а подавляющее большинство сообщений на эту тему посвящено *P. aeruginosa*. В этой связи особого внимания заслуживает работа по изучению действия этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) на различные виды *Pseudomonas*, разрушающей определенные связи в наружной мембране псевдомонад.

Ряд красителей под действием света обладал антимикробным эффектом в отношении некоторых видов псевдомонад, т. е. характеризовался наличием фотодинамической активностью в том числе таких высокоустойчивых к антимикробным агентам видов, как *Р. aeruginosa* и *Pseudomonas aureofaciens*. Это, прежде всего, арилметановые красители группы эозина – дихлорфлюоресцеин, йодэозин, эозинкалий, бенгальская роза, в обычных условиях антибиотически мало активные. Под влиянием облучения эти вещества приобретали способность тормозить рост многих флюоресцирующих бактерий*,* в том числе *Pseudomonas mendocina*.

Значительный фотодинамический эффект наблюдался также у акридиновых красителей – риванола и акридинового оранжевого, сафранина, тионина, крезол-блау и гематоксилина [6].

**Литература:**

1. Горбунов В. А., Титов Л. П., Ермакова Т. С. Многоцентровое исследование антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Pseudomonasaeruginosa* в Республике Беларусь // Здравоохранение. – 2007. – № 1. – С. 28 – 31.
2. Гудкова Е. И. Формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам возбудителей внутрибольничных инфекций и её микробиологический мониторинг // Бел. мед. журн. – 2003. – № 3. – С. 57 – 60.
3. Мележик И. А., Яворская Н. В., Шепелевич В. В., Кокозей В. Н. Роль биоплёнок *Рseudomonas aeruginosa* в развитии эндогенных инфекций // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – 2013. – № 3. – С. 1 – 28.
4. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. – 1999. – V. 284. – P. 1318 – 1322.
5. Davey M. E., O'Toole G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2000. – V. 64, № 4. – P. 847 –867.
6. Fung D. Y., Miller R. R. Effect of dyes on bacterial grow th// Appl. Microbiol. Gilbert, P., Das J., Foley I. 1997. Biofilms susceptibility to antimicrobials.— 1973. — 25, N 5. — P. 793—798.
7. Hachem RY, Chemaly RF, Ahmar CA, et al. (2007). "Colistin is effective in treatment of infections caused by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in cancer patients". Antimicrob. Agents Chemother. 51 (6): 1905–1911.
8. Japoni A., Farshad S., Alborzi A. *Pseudomonas aeruginosa*: Burn Infection, Treatment and Antibacterial Resistance // Iranian Red Crescent Medical Journal. – 2009. – V. 11. – Р. 244 – 253.
9. Lewis, K. 2000. Programmed death in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. V.64, - P.503-514.
10. Mah T.F., Pitts B., Pellock B. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance // Nature. – 2003. – V. 426. – Р. 306 – 310.
11. Mulcahy L.R., Isabella V.M., Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease // Microb. Ecol. – 2013. – V. 6. – Р. 76 – 79.

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, доцент Русакова Мария Юрьевна.