

УДК: 616.61/63-022.7-053.2-092+579.262

МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ТА ШЛЯХИ ПОДОЛАННЯ СТІЙКОСТІ ДО ПРОТИМІКРОБНИХ РЕЧОВИН У БАКТЕРІАЛЬНИХ БІОПЛІВКАХ

А.А. Водяник**Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна**

MECHANISMS OF DEVELOPMENT AND WAYS OF OVERCOMING ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN BACTERIAL BIOFILMS

Vodianyuk A.**O.O. Bohomolets National Medical University, Kiev, Ukraine**

The article provides an overview of current views on the mechanisms of antimicrobial resistance development in bacterial biofilms. Data about possible routes of how biofilms could shape activity of different antibacterial drugs is provided, as well as the results of our own studies of biofilms and their role in development of antimicrobial resistance.

Keywords: biofilm, urinary tract infection, antibiotic resistance.

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОТИВОМИКРОБНЫМ ВЕЩЕСТВАМ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНКАХ

Водяник А.А.**Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина**

В статье представлен обзор современных представлений о механизмах развития резистентности к противомикробным препаратам в бактериальных биопленках. Представлены данные о возможных путях того, как биопленки могут изменять активность различных антибактериальных препаратов, а также результаты собственных исследований биопленок и их роль в развитии противомикробной резистентности.

Ключевые слова: биопленка, инфекции мочевых путей, антибиотикорезистентность.**Адреса для кореспонденції:**

Водяник Аркадій Аркадійович – старший лаборант кафедри педіатрії №4, Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, робоча адреса: 01032, м. Київ, вул. Л. Толстого, 10; тел.: 067-508-58-77; e-mail: arkadythe1@gmail.com

Антибіотикорезистентність вважається важливою проблемою сучасної медицини. Одним з поширених шляхів розвитку стійкості до антимікробних препаратів є утворення бактеріальних біоплівки, які здатні формуватися як на біотичних так і на абіотичних поверхнях [1].

На сучасному етапі достеменно невідомо провідний механізм розвитку антимікробної резистентності в біоплівках. Зважаючи на те, що 80% усіх бактерій здатні формувати біоплівки (60% збудників нозокоміальної інфекції), а також на велику варіацію умов та місць де біоплівка може бути утворена, домінуючі механізми зменшення чутливості до антибіотиків мають варіювати.

Біоплівочні форми бактерій здатні збільшувати резистентність до усіх відомих груп антибіотиків, а також синтетичних протимікробних речовин в незалежності від їх механізму дії. Такий широкий спектр резистентності у значної варіації бактерій може пояснюватися тільки наявністю декількох механізмів розвитку стійкості, які доповнюють одне одного під час існування біоплівки [2].

До основних механізмів розвитку антибактеріальної стійкості відносять:

- нездатність антибіотику дифундувати крізь екстрацелюлярний матрикс;
- посилену передачу генів, що забезпечують стійкість до антибіотиків;
- експресію молекулярних насосів, що здійснюють ефлюкс антибіотику за межі клітини;
- інактивацію антибіотику внаслідок змін мікрооточення;
- наявність бактерій персистерів [4, 7].

Усі механізми стійкості до антибіотиків можна також класифікувати на:

- резистентність, що не успадковується (толерантність);
- резистентність, що успадковується.

До другої групи належать мутації в геномі бактеріальної клітини, які дозволяють уникнути дії антибіотиків. Іншими прикладами можуть бути передача плазмід, що відповідальні за синтез бета-лактамаз або ж експресія нових ефлюксних помп. До першої ж групи належать механізми, які дозволяють бактерії бути толерантною до антибіотиків певний час, але стійкість не може успадковуватися, до таких механізмів належать:

- специфічні умови середовища в яких тимчасово перебуває бактерія, що зменшує penetрацію антибіотику, чи унеможлиблює його активацію;
- індукційна толерантність, яка виникає у відповідь на вплив певних стресових факторів на бактерію;
- фізіологічна толерантність, яка виникає при певному рівні метаболізму всередині бактеріальної клітини.

Прикладом слугують бактерії персистерів, що не мають специфічних мутацій, однак є надзвичайно стій-

кими до дії більшості антибіотиків, навіть в надзвичайно високих концентраціях, яких не можна досягнути при терапії. [3, 5]

Можемо прослідкувати утворення "зачарованого кола". Утворення біоплівки призводить до появи гіпермутабельних штамів бактерій, через дію вищеописаних механізмів. Поява гіпермутантів утворює, так звану, адаптивну генну різноманітність, що дозволяє обирати штами з найбільшою здатністю до плівкоутворення, таким чином замикаючи коло. Однак, усі три ланки ланцюга окрім підсилення ефекту один одного, ще й окремо збільшують антибіотикорезистентність популяції бактерій.

Існує порівняно мало робіт, що демонструють механізм проникнення антибіотику через матрикс біоплівки або ж дають відповідь, які молекули здатні проникати через матрикс, а які ні. В першу чергу це пов'язано з технічною складністю виконання подібних експериментів, а також різноманітним складом матриксу біоплівки, який залежить від виду бактерії, віку біоплівки та умов її синтезу. Однак ряд робіт демонструють, що матрикс біоплівки здатен повністю блокувати penetрацію великих білкових молекул та значно знижувати швидкість дифузії менших з розмір молекул. Так було продемонстровано, що планктонні бактерії більш чутливі до H_2O_2 ніж бактерії в біоплівці, навіть зважаючи на те, що активність каталази була нижча в біоплівочних форм бактерій. Можливим поясненням підвищення мінімальної інгібувальної концентрації може слугувати гіпотеза, що зменшення швидкості penetрації антибіотику дозволяє бета-лактамазам та іншим інактивуючим ферментам бактерій нейтралізувати дію антибіотиків, тим самим збільшуючи стійкість бактерій. Сусі та співавтори показали, що ципрофлоксацин проникає до біоплівки утвореної синьогнійною паличкою за 21 хвилину, в порівнянні, ципрофлоксацин здатен проникнути всередину планктонних бактерій за 40 секунд. Дане припущення підтверджується тим фактом, що антибіотики які не здатні руйнуватися під дією бактеріальних ферментів, такі як фторхінолони, демонструють високу антибіоплівочну активність [6].

Біоплівки сприяють посиленню передачі генів між бактеріями. Це важлива обставина так як бактерії, які є резистентними до антибіотиків і можуть швидко передавати гени стійкості до чутливих бактерій, в такий самий спосіб бактерії можуть посилювати свою вірулентність. На реплікацію генів впливає система кворум-сенсінгу, бактеріальна клітина під впливом аутоіндукторів може активувати гени стресостійкості та гени, що відповідають за підвищення вірулентних властивостей бактерій [9].

Велика кількість мутантних бактерій у складі біоплівки пояснюється не тільки горизонтальним переносом генів між клітинами, а також альтерацією генів, що є відповідальними за репарацію ДНК під час оксидативних пошкоджень. В біоплівці спостерігається підвищення

кількості активних форм кисню, що разом з недосконалістю антиоксидантної системи бактерій призводить до оксидативного стресу, який у свою чергу призводить до збільшення мінливості бактерій у біоплівці та селекції бактерій, що здатні синтезувати ефлюксні насоси. Ці насоси або помпи здатні переносити зсередини клітини у зовнішнє середовище різноманітні антибактеріальні речовини, тим самим збільшуючи свою стійкість до дії антибіотиків [8].

Збільшення частки бактерій з підвищеною здатністю до мутації ще один з механізмів розвитку антибактеріальної стійкості. Було продемонстровано, що при розвитку гострої бактеріальної інфекції кількість гіпермутабельних штамів бактерій не перевищувала один відсоток. При дослідженні бактерій виділених з осередків хронічних інфекцій, більше 30% бактерій мали гіпермутабельні властивості. Хоча більшість мутацій є за своїм впливом або нейтральними або негативними (навіть летальними) для окремої бактерії, загалом для популяції бактерій збільшення кількості мутацій носить величезне значення, оскільки збільшує вірогідність до розвитку мутації, що стане ключовою в розвитку стійкості до антибіотиків. В експериментах де були кокультивовані звичайні та мутабельні штами бактерій показано, що гіпермутабельні штами виступали захисним щитом для сприйнятливих до антибіотиків бактерій [9, 11].

Бактерії всередині біоплівки здатні одночасно продукувати ферменти, що руйнують антибіотики, змінювати експресію генів, що відповідають за синтез «мішеней» для антибіотика, роблячи їх малоафінними до антибактеріальних речовин, а також гіперекспресувати ефлюксні помпи, які здатні вивести широкий спектр внутрішньоклітинних субстратів. Наведені властивості бактерій доповнюються тим, що ферменти, які руйнують антибіотики накопичуються у матриці біоплівки і досягають там значних концентрацій, таким чином мінімальна інгібуєча концентрація антибіотика має зростати задля досягнення бактеріостатичного або бактерицидного ефекту. Було продемонстровано, що проникнення антибіотика погіршується ще й через те, що позитивно заряджені молекули антибіотика утворюють комплекси з негативно зарядженими полісахаридами матриксу біоплівки [10].

Пригнічення експресії білків ефлюксних помп призвело до зменшення можливості синтезувати біоплівки, втрати бактеріями пілій, які критично важливі для міжцелюлярної адгезії. Найбільший ефект від інгібування синтезу ефлюксних помп був помічений на етапі формування біоплівки, блокування помп у зрілій біоплівці майже не мала антибіоплівоного ефекту. Також варто відмітити, що вказаний ефект мали не тільки інгібування основних видів ефлюксних помп, а й ізольоване пригнічення допоміжних насосів, які виконують лише доповнюючу роль. Можна вважати, що процес утворення пілій, синтез матриксу біоплівки та експресія ефлюксних насо-

сів має спільні шляхи регуляції, які залишаються до кінця не вивченими.

Ефлюксні помпи є цікавою мішенню в боротьбі з біоплівками, оскільки блокування даних молекулярних структур мембрани бактерій призводить до зменшення толерантності до антибіотиків, зменшення адгезивних властивостей бактерій та їх здатності синтезувати основні компоненти позаклітинного матриксу. Наразі синтезовані інгібітори помп такі як: СССР, CPZ, але попри багатобіцяючі результати *in vitro*, вони продемонстрували достатньо високу токсичність та погані фармакокінетичні властивості в живому організмі [3].

Бактерії здатні уникати бактерицидного ефекту антибіотиків навіть без зміни свого генотипу. Такі бактерії мають назву «персистери», вони не здатні розмножуватися в присутності антибіотика, але й не гинуть від його дії. Бактерії-персистери вважаються однією з головних причин хронізації інфекційного процесу. Механізми захисту у бактерій-персисторів до кінці не зрозумілі, однак найбільш вірогідним механізмом стійкості є сповільнення процесів метаболізму всередині клітини, що дозволяє бактерії персистувати у найнесприятливіших умовах середовища. Біоплівка є ідеальним середовищем існування для персистерів. Через наявні градієнти розподілу кисню і поживних речовин всередині біоплівки, в її середніх шарах бактерії змушені зменшувати швидкість свого метаболізму через брак кисню і накопичення продуктів обміну. Саме в цих шарах біоплівки і концентруються бактерії-персистери, кількість яких у стаціонарну фазу росту досягає 1% популяції [4, 6, 9].

Kwan та співавтори продемонстрували, що клітини-персистери мають суттєво знижену швидкість метаболізму, ключову роль має синтез білку. Було доведено, що бактерії, які мають знижений рівень синтезу білка стають толерантними до дії антибіотика. Найпоширеніший механізм пригнічення білкового синтезу полягає в дисбалансі у системі токсин-антитоксин всередині бактеріальної клітини. Класичним прикладом виступає система TisB/IstR-1, в якій TisB-токсин здатен пригнічувати синтез білка та АТФ, тим самим переключаючи клітину на «сплячий» стан, в якому вона може уникати дії антибіотиків. Інші токсини здатні блокувати синтез мішеней для антибіотиків також зменшуючи чутливість до препаратів [8].

Пусковим гачком для активації токсин-антитоксин системи є гуанозин тетрафосфат (ppGpp). ppGpp продукується специфічними білками RelA та SpoT, коли клітина відчуває брак у продуктах харчування. Основна функція гуанозин тетрафосфату полягає в активації синтезу фактора стресостійкості сігма для стаціонарної фази росту (RpoS) та фактора стресостійкості сігма для місфолдних протеїнів періплазми (RpoE). Важливість фактору RpoS наочно демонструє експеримент, де кишкові палички дефектні за геном RpoS були в 20 разів чутливішими до дії ампіциліну ніж бактерії в яких синтез даного фактору

перебував в межах норми. ρ Grp напряду пригнічує реплікацію ДНК та синтез білків, а також гуанозин тетрафосфат є ключовим фактором в активації токсинів HlrA та системи MazF/MazE і переходу бактеріальної клітини до персистентної форми. Дія токсину HlrA пов'язана з інактивацією фактора трансляції EF-Tu шляхом його фосфорилування. Активація цього токсину може виникати внаслідок мутації у його структурі, що зменшує його афінитет до антитоксину, результатом є гальмування швидкості метаболізму бактерії.

Бактерії-персистери здатні до «пробудження» та переходу до стадії швидкого розмноження, таким чином бактерії забезпечують пул клітин, які здатні пережити несприятливі умови, а потім поновлювати популяцію бактерій у складі біоплівки.

За результатами проведених нами досліджень, було встановлено, що зі збільшенням розміру біоплівки сформованої клінічними ізолятами *E.coli* (розмір визначався методом вимірювання оптичної щільності зразків після фарбування метиленовим синім) зменшувалася ефективність дії цефалоспоринових та аміноглікозидних антибіотиків, даний ефект може бути пояснений меншою пене-трацією антибіотика до нижніх шарів біоплівки [12].

Наразі питання найбільш ефективної групи антибіоплі-вочних антибіотиків є невирішеним. Біоплівка та її здатність посилювати резистентність мікроорганізмів суттєво варіює в залежності від виду бактерії, віку біоплівки, місця її формування. На сучасному етапі розвитку науки про біоплівки дані про ефективність антибіотиків тільки накопичуються і їх недостатньо для всеохоплюючих висновків [3].

Щоб мати високу ефективність проти біоплівки антибіотик має добре проникати через позаклітинний матрикс, в незалежності від того якими речовинами він утворений, не руйнуватися під дією бактеріальних ферментів, бути активним за різних значень рН та інших умов мікросередовища, антибіотик має впливати на бактерії персистери. Найбільш ефективними антибіотиками в дослідженнях *in vitro* по відношенню до бактерій у складі біоплівки є представники груп макролідів, фторхінолонів. Цей факт може бути пояснений тим, що дані антибіотики мають широкий спектр дії, легко проходять ліпідні бар'єри та проникають всередину мукополісахаридів та не руйнуються бактеріальними бета-лактамазами. Ефективними препаратами є представники карбапенемів, оскільки це антибіотики резерву і стійкість мікроорганізмів майже відсутня. Чутливість до амінопеніцилінів, цефалоспоринових, синтетичних протимікробних таких як похідні сульфаніламідів та нітрофуранів значно варіює в залежності від дослідження.

Бета-лактамі антибіотики обмежено проникають в біоплівку, впливають лише на бактерії, що діляться таким чином, бактерії персистери всередині біоплівки є майже недосяжною мішенню для бета-лактамічних антибіотиків [1].

Аміноглікозиди здатні проникати через матрикс який складається з целюлози, однак альгінатний матрикс, що характерний для синьогнійної палички є значною перешкодою для даного класу антибіотиків.

Колістин справляє прямо протилежну дію до бета-лактамічних антибіотиків – він впливає на бактерії, що не діляться і майже не впливає на бактерії ззовні біоплівки. Дані властивості колістину дають підставу вважати ефективними комбінації цього антибіотика з протимікробними засобами, що впливають на бактерії, що діляться.

Бактерії у біоплівці можуть підвищувати свою стійкість до антибіотиків у більше ніж 1000 разів, що робить неможливим застосування певних груп антибіотиків у терапії біоплівкоасоційованих захворювань. Тому нагальним є питання розробки альтернативних методів та хіміопрепаратів для попередження утворення біоплівок та покращення лікування хворих з хронічними інфекційними процесами [7].

Порівняльне дослідження ефективності різноманітних антимікробних препаратів на сформовану біоплівку проведене на кафедрі педіатрії №4 продемонструвало, що похідні нітрофуранів мають більшу ефективність до біоплівкових форм бактерій, аніж амінопеніциліни (амоксцилін клавуланат), цефалоспоринони (цефтріаксон, цефіксим) та аміноглікозиди (гентаміцин) [12].

Література/References

1. Romlingand U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*. 2012; 272(6):541–61.
2. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren S, J Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *NatRevMicrobiol*. 2015;13(5):269–84.
3. Tenke P, Kovacs B, Jckel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology*. 2006; 24(1):13–20.
4. Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985; 27(4):619–24.
5. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ Intracellular bacterial biofilm-like pods urinary tract infections. *Science*.2003; 301(5629):105–07.
6. Robino L, Scavone P, Araujo L, Algorta G, Zunino P, Vignoli R. Detection of intracellular bacterial communities in a child with *Escherichia coli* recurrent urinary tract infections. *Pathogens and Disease*. 2013; 68(3):78–81.
7. Lane MC, Lockatell V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel J.R, et al. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infection and Immunity*. 2005; 73(11):7644-56.

8. Vollmerhausen TL, Katouli M. Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from hospitalised children and adults with urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(6):975-82.
9. Villemur R, Comeau Y, Dziel E. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *Journal of Bacteriology.* 2001; 183(4):1195-1204.
10. Tapiainen T, Hanni AM, Salo J, Ikheimo I, Uhari M. *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(1):111-15.
11. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol.* 2002 Jun;13(3):228-33.
12. Antibiotic Sensitivity Determining For Planktonic And Biofilm Forms Of Bacteria In Children With Urinary Tract Infections / Druzenko M.G., Vodianyuk A.A., Grechukha Y.O., Kornijko Y.Y. // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2017. – С. 144.

Відомості про автора:

Водяник Аркадій Аркадійович – старший лаборант кафедри педіатрії №4, Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, робоча адреса: 01032, вул. Л. Толстого, 10; тел.: 067-508-58-77; e-mail: arkadiythe1@gmail.com

© А.А. Водяник, 2018