

Занятие семинарского типа № 3

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Антибиотикорезистентность

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Механизмы резистентности к антибактериальным препаратам

Основой терапевтического действия антибактериальных препаратов является подавление жизнедеятельности возбудителя инфекционного заболевания в результате угнетения более или менее специфичного для микроорганизмов метаболического процесса. При этом угнетение происходит в результате связывания антибиотика с мишенью, в качестве которой может выступать или фермент, или структурная молекула микроорганизма.

Резистентность микроорганизмов к антибиотикам может быть природной и приобретенной.

✓ Истинная природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени для воздействия антибиотика (например, микоплазмы не имеют клеточной стенки, поэтому не чувствительны лекарственным препаратам, действующим на данном уровне) или недоступности мишени вследствие первоначально низкой проницаемости препарата (например, грамотрицательные микроорганизмы менее проницаемы для высокомолекулярных соединений, чем грамположительные бактерии, т.к. их наружная мембрана имеет «маленькие» поры) или ферментативной инактивации. В случае наличия у бактерий природной устойчивости антибиотики клинически неэффективны. Природная резистентность является постоянным видовым признаком микроорганизмов и легко прогнозируется.

✓ Под приобретенной устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов микроорганизмов сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Возможны ситуации, когда большая часть микробной популяции проявляет приобретенную устойчивость. Появление у бактерий приобретенной резистентности не обязательно сопровождается снижением клинической эффективности антибиотика. Во всех случаях формирование резистентности генетически обусловлено: приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов.

Генетические основы приобретенной резистентности. Устойчивость к антибиотикам определяется и поддерживается генами резистентности (R-генами) и условиями, способствующими их распространению в микробных популяциях. При этом приобретенная лекарственная устойчивость может возникать и распространяться в бактериальной популяции в результате:

✓ мутаций в хромосоме бактериальной клетки с последующей селекцией (отбором) мутантов. Особенно легко селекция реализуется в при-

сутствии антибиотиков, т.к. в этих условиях мутанты получают преимущество перед остальными клетками популяции, чувствительными к лекарственному препарату. Мутации возникают независимо от применения антибиотика, т.е. собственно лекарственный препарат не влияет на частоту мутаций и не является их причиной, однако служит фактором отбора. Затем резистентные клетки дают потомство и могут передаваться в организм следующего хозяина (человека или животного), формируя и распространяя резистентные штаммы.

При этом мутации могут быть:

1) единичные мутации (если мутация произошла в одной клетке, в результате этого в ней синтезируются измененные белки);

2) множественные мутации (серия мутаций, в результате которых изменяется не один, а целый набор белков, например, пенициллинсвязывающих белков у пенициллин-резистентного пневмококка).

✓ **переноса трансмиссивных плазмид резистентности (R-плазмид).**

Плазмиды резистентности (трансмиссивные плазмиды) обычно кодируют перекрестную устойчивость к нескольким семействам антибиотиков. Впервые такая множественная резистентность была описана японскими исследователями в отношении кишечных бактерий. В настоящее время показано, что она встречается и у других групп бактерий. Некоторые плазмиды могут передаваться между бактериями разных видов, поэтому один и тот же ген резистентности можно встретить у бактерий, таксономически далеких друг от друга. Так, например, β -лактамаза, кодируемая плазмидой TEM-1, широко распространена у грамотрицательных бактерий и встречается у кишечной палочки и других кишечных бактерий, а также у гонококка, резистентного к пенициллину, и гемофильной палочки, резистентной к ампициллину;

✓ **переноса транспозонов, несущих r-гены** (или мигрирующих генетических последовательностей). Транспозоны могут мигрировать с хромосомы на плазмиду и обратно, а также с плазмиды на другую плазмиду. В этой связи, гены резистентности могут передаваться далее дочерним клеткам или при рекомбинации другим бактериям-реципиентам.

Реализация приобретенной устойчивости. Изменения в геноме бактерий приводят к тому, что изменяются и некоторые свойства бактериальной клетки, в результате этого она становится устойчивой к антибактериальным препаратам. Обычно антимикробный эффект лекарственного препарата осуществляется следующим образом: агент должен связаться с бактерией, пройти через ее оболочку, затем он должен быть доставлен к месту действия, после этого лекарственный препарат взаимодействует с внутриклеточными мишенями.

Реализация приобретенной лекарственной устойчивости возможна на каждом из последующих этапов:

✓ **модификация мишени.** Фермент-мишень может быть изменен так, что его функции не нарушаются, но способность связываться с химиопрепа-

ратом (аффинность) резко снижается или может быть включен «обходной путь» метаболизма, т.е. в клетке активируется другой фермент, который не подвержен воздействию данного лекарственного препарата.

✓ **«недоступность» мишени** за счет снижения проницаемости клеточной стенки и клеточных мембран или «эффлюко»-механизма, в результате которого клетка как бы «выталкивает» из себя антибиотик.

✓ **инактивация лекарственного препарата бактериальными ферментами.** Некоторые бактерии способны продуцировать особые ферменты, которые делают лекарственные препараты неактивными (например, β -лактамазы, аминогликозид-модифицирующие ферменты, хлорамфениколацетилтрансфераза). При этом β -лактамазы представляют собой ферменты, разрушающие β -лактамное кольцо с образованием неактивных соединений. Гены, кодирующие данные ферменты, широко распространены среди бактерий и могут присутствовать как в составе хромосомы, так и в составе плазмиды.

Для борьбы с инактивирующим действием β -лактамаз используют вещества – ингибиторы (например, клавулановую кислоту, сульбактам, тазобактам). Данные вещества содержат в своем составе β -лактамное кольцо и способны связываться с β -лактамазами, предотвращая их разрушительное воздействие на β -лактамные антибиотики. При этом собственная антибактериальная активность таких ингибиторов очень низкая. Клавулановая кислота ингибирует большинство известных β -лактамаз. Ее комбинируют с пенициллинами: амоксициллином, тикарциллином, пиперациллином и др.

В целом предупредить развитие антибиотикорезистентности у бактерий практически невозможно, однако необходимо использовать противомикробные препараты так, чтобы не способствовать развитию и распространению устойчивости: применять антибиотики строго по клиническим показаниям, избегать их использования с профилактической целью, через 10–15 дней антибиотикотерапии следует заменять лекарственный препарат, по возможности, использовать лекарственные препараты узкого спектра действия, ограничено применять антибиотики в ветеринарии и не использовать их в качестве факторов роста.

В настоящее время различают следующие биохимические механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам:

1. модификация мишени действия;
2. инактивация антибиотика;
3. активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс);
4. нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки;
5. формирование метаболического «шунта».

1.1. Механизмы устойчивости к антибактериальным препаратам отдельных групп

β-лактамы антибиотики

Ферментативная инактивация. Наиболее распространенным механизмом устойчивости микроорганизмов к β-лактамам является их ферментативная инактивация в результате гидролиза одной из связей β-лактамного кольца ферментами β-лактамазами.

К настоящему времени описано более 200 ферментов, различающихся по следующим практически важным свойствам:

✓ Субстратный профиль: способность к преимущественному гидролизу тех или иных β-лактамовых антибиотиков, например, пенициллинов или цефалоспоринов, или тех и других в равной степени.

✓ Локализация кодирующих генов (плазмидная или хромосомная). Данная характеристика определяет эпидемиологию резистентности. При плазмидной локализации генов происходит быстрое внутри- и межвидовое распространение резистентности, а в случае хромосомной – наблюдают распространение резистентного клона.

✓ Чувствительность к ингибиторам (клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму), применяющимся в медицинской практике.

β-лактамазы встречаются у подавляющего большинства клинически значимых микроорганизмов, важным исключением являются микроорганизмы рода *Streptococcus*.

Все известные в настоящее время β-лактамазы классифицируют на 4 молекулярных класса, в пределах которых ферменты характеризуются общностью свойств и выраженной гомологией. Предполагается, что β-лактамазы классов А, С и D эволюционировали из бактериальных пенициллиносвязывающих белков (ПСБ) в почвенных экосистемах в результате селективного прессинга β-лактамовых антибиотиков, продуцируемых некоторыми микроорганизмами. β-лактамазы перечисленных классов относятся к ферментам «серинового» типа (по аминокислоте, находящейся в активном центре фермента). Ферменты класса В относятся к металлоэнзимам, поскольку в качестве кофермента в них присутствует атом цинка, их происхождение менее ясно.

Наиболее важные ферменты и их свойства приведены в табл. 1.

К наиболее распространенным ферментам относятся стафилококковые β-лактамазы (встречаются у 60–80% штаммов) и β-лактамазы широкого спектра (БЛРС) грамотрицательных бактерий (среди штаммов *E. coli* встречаются в 30–40% случаев). Несмотря на широкое распространение указанных ферментов, они не представляют серьезной проблемы для терапии, поскольку многие современные β-лактамовые антибиотики (цефалоспорины II–IV поколений, ингибиторозащищенные пенициллины, карбапенемы) не чувствительны к гидролизу.

В настоящее время наибольшее значение для клинической практики имеют плазмидные БЛРС грамотрицательных бактерий, поскольку они способны разрушать цефалоспорины III и, в меньшей степени, IV поколения. Традиционные методы оценки антибиотикочувствительности очень часто не выявляют данный механизм устойчивости. Наиболее часто БЛРС встречаются у микроорганизмов рода *Klebsiella*, достаточно часто у *E. coli* и *Proteus* spp., реже у других грамотрицательных бактерий. В России в отдельных учреждениях частота распространенности данных ферментов среди клебсилл достигает 90%.

При тяжелых нозокомиальных инфекциях, вызванных *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. и некоторыми другими микроорганизмами, в процессе терапии цефалоспоридами III поколения примерно в 20% случаев формируется резистентность к данным антибиотикам, обусловленная гиперпродукцией хромосомных β -лактамаз класса C. В таких ситуациях терапевтическую эффективность сохраняют цефалоспорины IV поколения и карбапенемы. К неблагоприятным тенденциям, наблюдаемым в последнее время, следует отнести мобилизацию ферментов класса C на плазмиды, что создает реальные предпосылки для их широкого распространения.

Таблица 1

Наиболее распространенные β -лактамазы и их свойства

Ферменты	Характеристика
Плазмидные β -лактамазы класса A стафилококков	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, кроме метициллина и оксациллина. Чувствительны к ингибиторам
Плазмидные β -лактамазы широкого спектра класса A грамотрицательных бактерий	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I поколения. Чувствительны к ингибиторам
Плазмидные β -лактамазы расширенного спектра класса A грамотрицательных бактерий	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I–IV поколения. Чувствительны к ингибиторам
Хромосомные β -лактамазы класса C грамотрицательных бактерий	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I–III поколения. Не чувствительны к ингибиторам
Хромосомные β -лактамазы класса A грамотрицательных бактерий	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I–II поколения. Чувствительны к ингибиторам
Хромосомные β -лактамазы класса B грамотрицательных	Эффективно гидролизуют практически все β -лактамные антибиотики, включая карбапе-

бактерий

немы. Не чувствительны к ингибиторам.

Плазмидные β -лактамазы класса D грамотрицательных бактерий (преимущественно *P. aeruginosa*)

Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I–II поколения. Многие способны также гидролизовать цефалоспорины III поколения. Большинство не чувствительны к ингибиторам.

Хромосомные β -лактамазы класса B, разрушающие карбапенемы, распространены среди таких видов микроорганизмов, как *S. maltophilia*.

Снижение проницаемости внешних структур грамотрицательных бактерий. Внешняя мембрана грамотрицательных микроорганизмов является препятствием для проникновения β -лактамных антибиотиков внутрь клетки. Транспорт антибиотика через внешнюю мембрану к чувствительным мишеням осуществляется через воронкообразные белковые структуры, получившие название «порины» или «пориновые каналы». В результате мутаций возможна полная или частичная утрата поринов, приводящая к выраженному в различной степени снижению чувствительности к β -лактамным антибиотикам. Данный механизм устойчивости встречается практически среди всех грамотрицательных микроорганизмов, обычно в сочетании с другими механизмами.

Активное выведение β -лактамных антибиотиков из микробной клетки. Ранее полагали, что β -лактамные антибиотики активно не выводятся из микробной клетки. Однако, в последние годы появились сообщения о наличии у *P. aeruginosa* транспортных систем, осуществляющих активное выведение ряда из них и, прежде всего, карбапенемов.

Модификация мишени действия. Мишенями действия β -лактамных антибиотиков являются ферменты – ПСБ, участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий. В результате модификации у некоторых ПСБ уменьшается сродство к β -лактамным антибиотикам, что проявляется в повышении минимальной подавляющей концентрации (МПК) этих лекарственных препаратов и снижении клинической эффективности. При этом клиническое значение имеет устойчивость среди стафилококков и пневмококков. Гены модифицированных ПСБ локализованы на хромосомах.

✓ Устойчивость стафилококков (*S. aureus*) обусловлена появлением у микроорганизмов дополнительного ПСБ (ПСБ_{2a}).

Маркером наличия ПСБ_{2a} является устойчивость к метициллину или оксациллину.

Независимо от результатов оценки *in vitro* при инфекциях, вызываемых метициллинрезистентным золотистым стафилококком (MRSA), все β -

лактамы антибиотики следует считать клинически неэффективными и не использовать в терапии.

В некоторых отделениях реанимации, онкологии и гематологии в России частота распространения MRSA превышает 50–60%, что создает очень серьезные проблемы для терапии.

✓ Устойчивость пневмококков обусловлена появлением в генах, кодирующих ПСБ, чужеродной ДНК, происхождение которой связывают с зелеными стрептококками. При этом перекрестная устойчивость между отдельными β-лактамами антибиотиками неполная. Значительная часть штаммов, устойчивых к пенициллину, сохраняет чувствительность к цефалоспорином III поколения и карбапенемам. В настоящее время накоплено значительное количество данных, свидетельствующих о сохранении клинической эффективности β-лактамов антибиотиков при инфекциях диареи путешественников (ДП), вызываемых штаммами с промежуточным уровнем устойчивости, однако при инфекциях центральной нервной системы (менингитах) эффективность данных антибиотиков явно снижается. Полученные данные послужили основой для пересмотра критериев чувствительности пневмококков к амоксициллину. Кроме того, в настоящее время обсуждается целесообразность изменения критериев чувствительности к пенициллину.

✓ Данные о частоте распространения в России пенициллинорезистентных пневмококков ограничены. В Москве, в период с 1998 г. по 2001 г., частота встречаемости штаммов пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину варьировалась в пределах 10–22%. При этом высокий уровень устойчивости отмечали не более, чем у 1–2% штаммов.

✓ Среди грамотрицательных бактерий устойчивость, связанная с модификацией ПСБ, встречается редко. Определенное значение данный механизм устойчивости имеет у *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae*. Микроорганизмы, проявляют устойчивость не только к природным и полусинтетическим пеницилинам, но и к ингибиторозащищенным препаратам.

Аминогликозиды

Ферментативная инактивация Основным механизмом устойчивости к аминогликозидам является их ферментативная инактивация путем модификации. Модифицированные молекулы аминогликозидов утрачивают способность связываться с рибосомами и подавлять биосинтез белка. Описаны три группы аденозинмонофосфатов (АМФ), осуществляющих инактивацию аминогликозидов, путем их связывания с различными молекулами: ААС – присоединяющие молекулу уксусной кислоты, АРН – присоединяющие молекулу фосфорной кислоты, нуклеотидил- или АНТ – присоединяющие молекулу нуклеотида аденина.

Общее число описанных АМФ превышает 50, каждый из них характеризуется более или менее уникальным субстратным профилем. Гены ферментов локализуются, как правило, на плазидах, что приводит к быстрому внутри-

и межвидовому распространению устойчивости. Среди грамположительных и грамотрицательных бактерий распространены различные ферменты (табл. 2).

На практике среди грамотрицательных бактерий могут встречаться практически все комбинации устойчивости к отдельным аминогликозидам. Это связано с разнообразием субстратных профилей отдельных ферментов и возможностью наличия у бактерии одновременно нескольких генов АМФ.

Для России характерна высокая частота распространения устойчивости среди грамотрицательных бактерий к гентамицину и тобрамицину, что, вероятно, связано с необоснованно широким применением гентамицина.

Частота устойчивости к нетилмицину, как правило, несколько ниже.

Устойчивость к амикацину встречается еще более редко.

Число АМФ, встречающихся у грамположительных бактерий, не столь велико. Определенное клиническое значение имеет распространение среди грамположительных бактерий бифункционального фермента ААС (6')-АРН (2"), разрушающего большинство клинически значимых аминогликозидов, кроме стрептомицина и спектиномицина.

Таблица 2

Характеристика АМФ

Ферменты	Устойчивость к антибиотикам
Грамположительные микроорганизмы	
АРН (3')-III	КАН, НЕО, АМК
АНТ (4')-I	ТОБ, АМК
АНТ (6)-I	СТР
ААС (6')-АРН (2")	ГЕН, ТОБ, НТЛ, АМК
Грамотрицательные микроорганизмы	
АНТ (2")	КАН, ГЕН, ТОБ
ААС (2')	ГЕН, ТОБ, НТЛ
ААС (3)-V	ГЕН, ТОБ, НТЛ
ААС (3)-I	ГЕН
ААС (6')-I	ТОБ, НТЛ, АМК
АРН (3')-I	КАН, НЕО
АРН (3')-II	КАН, НЕО

АРН (3')-VI	КАН, АМК
АРН (3')-I	КАН, НЕО
АРН (3')-II	КАН, НЕО
АРН (3')-VI	КАН, АМК

КАН – канамицин; НЕО – неомицин; СТР – стрептомицин; ГЕН – гентамицин; ТОБ – тобрамицин; НТЛ – нетилмицин; АМК – амикацин.

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что маркером наличия этого фермента является устойчивость к гентамицину, другие ферменты, распространенные среди грамположительных бактерий, не инактивируют данный антибиотик.

Снижение проницаемости внешних структур. Проникновение аминогликозидов через внешнюю и цитоплазматическую мембраны бактерий является сложным процессом. Низкая природная чувствительность к аминогликозидам некоторых микроорганизмов (например, *B. cereus*) связана именно с недостаточной проницаемостью для АМП внешней мембраны этих микроорганизмов. Их мутации, приводящие к изменению структуры липополисахарида у *E. coli* и *P. aeruginosa*, могут обусловить значительное повышение устойчивости к аминогликозидам.

Природная устойчивость к аминогликозидам анаэробных микроорганизмов объясняется тем, что транспорт данных антибиотиков через цитоплазматическую мембрану связан с системами переноса электронов, которые у анаэробов отсутствуют. По этой причине факультативные анаэробы в условиях анаэробии, становятся значительно более устойчивыми к аминогликозидам, чем в аэробных условиях.

Практически важным фактом является природная устойчивость к аминогликозидам стрептококков и энтерококков, связанная с преимущественно анаэробным метаболизмом данных бактерий и, соответственно, невозможностью транспорта антибиотиков к чувствительным мишеням. При совместном воздействии на микробную клетку аминогликозидных и β -лактамных антибиотиков, последние нарушают структуру цитоплазматической мембраны бактерий и облегчают транспорт аминогликозидов. В результате этого между β -лактамными антибиотиками и аминогликозидами проявляется выраженный синергизм.

Появляются данные о том, что аминогликозиды могут подвергаться активному выведению из микробной клетки.

Модификация мишени действия. Основной мишенью действия аминогликозидов является 30S субъединица бактериальной рибосомы. В некоторых случаях устойчивость может быть связана с ее модификацией. Распро-

странение и клиническое значение устойчивости, связанной с модификацией мишени незначительно.

Хинолоны/ Фторхинолоны

Модификация мишени действия. Ведущим механизмом устойчивости к хинолонам/ фторхинолонам является модификация мишеней – двух бактериальных ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, опосредующих конформационные изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации. Каждый из ферментов состоит из четырех субъединиц. ДНК-гираза состоит из двух *gyrA* и двух *gyrB* субъединиц (соответствующие гены *gyrA* и *gyrB*). Топоизомераза IV состоит из субъединиц *parC* и *parE* (соответствующие гены *parC* и *parE*). Гены обоих ферментов локализованы на бактериальной хромосоме.

Поскольку топоизомеразы выполняют различные функции, то для подавления жизнедеятельности микробной клетки достаточно ингибировать активность только одного фермента, активность второго может сохраняться. Данная особенность объясняет тот факт, что для всех хинолонов можно выделить первичную и вторичную мишень действия. Первичной мишенью является тот фермент, к которому данный хинолон проявляет наибольшее сродство. Хинолонов, проявляющих абсолютно одинаковое сродство к обоим топоизомеразам, не существует.

У грамотрицательных бактерий наибольшее сродство хинолоны проявляют к ДНК-гиразе, благодаря чему именно этот фермент является первичной мишенью их действия.

У грамположительных бактерий для большинства хинолонов первичной мишенью действия является топоизомераза IV, хотя для спарфлоксацина и гатифлоксацина – ДНК-гираза. Моксифлоксацин и гемифлоксацин, вероятно, обладают приблизительно одинаковым сродством к обоим ферментам.

Основным механизмом устойчивости к хинолонам является изменение структуры топоизомераз в результате мутаций в соответствующих генах и аминокислотных замен в молекулах ферментов. Аминокислотные замены, в свою очередь, приводят к снижению сродства хинолонов к ферментам и повышению МПК лекарственных препаратов. Частота возникновения мутаций, вероятно, незначительно зависит от воздействия хинолонов. Однако, формирование устойчивых штаммов возможно лишь в результате селекции на фоне действия лекарственных препаратов. В подавляющем большинстве случаев устойчивость формируется ступенчато. После возникновения и селекции мутаций в генах фермента, являющегося первичной мишенью для действия хинолонов, МПК лекарственных препаратов обычно повышается в 4–8 раз, антибактериальный эффект проявляется за счет подавления активности фермента, являющегося вторичной мишенью. В случае, если воздействие хинолонов на микроорганизм продолжается, то возможно возникновение и селекция мутаций во вторичной мишени и, как следствие, повышение МПК еще в

4–8 раз. У штаммов бактерий с высоким уровнем устойчивости обычно обнаруживают несколько мутаций в генах обеих топоизомераз.

Многие исследователи полагают, что фторхинолоны, обладающие примерно одинаковым сродством к обоим топоизомеразам, в наименьшей степени способствуют селекции устойчивости. Это связано с тем, что для формирования устойчивого штамма мутации должны произойти одновременно в генах обоих ферментов, вероятность двойных мутаций существенно ниже, чем одиночных.

Важно отметить, что, за некоторыми исключениями, мутации в генах топоизомераз приводят к приблизительно одинаковому снижению сродства к ферментам для всех хинолонов. Однако, клиническое значение это обстоятельство приобретает лишь в том случае, если МПК становится выше фармакодинамически обоснованного критерия чувствительности. Так, например, при исходных величинах МПК левофлоксацина и моксифлоксацина в отношении штамма пневмококка 1,0 и 0,12 мг/л, соответственно, снижение сродства хинолонов к топоизомеразе IV в 8 раз приведет к увеличению МПК до 8,0 и 1,0 мг/л. По фармакодинамически обоснованным критериям мутантный штамм окажется устойчивым к левофлоксацину, но сохранит чувствительность к моксифлоксацину.

Активное выведение. В последние годы накапливаются данные о широком распространении среди грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов устойчивости, связанной с активным выведением хинолонов. У штаммов с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам данный механизм часто сочетается с модификацией мишеней.

В России устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацину и офлоксацину) является реальной проблемой при лечении нозокомиальных инфекций. Быстрее всего резистентность формируется у штаммов *P. aeruginosa*. Появляются данные о росте устойчивости к фторхинолонам среди пневмококков.

Макролиды, кетолиды и линкозамиды

Модификация мишени действия. Основной мишенью действия макролидов, кетолидов и линкозамидов является 50S субъединица бактериальной рибосомы. Несмотря на различия в структуре, все эти антибиотики имеют общий участок связывания с рибосомой. У большинства бактерий устойчивость возникает в результате метилирования 23S-субъединицы рекомбинантной РНК (рРНК). Известно около 20 генов (*erm* – erythromycin ribosome methylation), кодирующих фермент метилазу, они ассоциированы с транспозонами и могут локализоваться как на плазмидах, так и на хромосомах. Метилазы широко распространены среди многих аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Метилирование мишени действия макролидов обуславливает высокий уровень устойчивости к этим антибиотикам (МПК > 32–64 мг/л).

В настоящее время описано два варианта биосинтеза метилазы: конститутивный и индуцибельный.

При конститутивном типе синтез фермента не зависит от внешних условий. В этой связи, бактерии проявляют устойчивость ко всем макролидам и линкозамидам.

При индуцибельном типе синтеза фермента для его инициации необходима индукция. Синтез стрептококковых метилаз индуцируется всеми макролидами и линкозамидами, соответственно микроорганизмы проявляют устойчивость к данным антибиотикам. При этом синтез стафилококковых метилаз способен индуцировать только 14- и 15-членные макролиды, соответственно, микроорганизмы проявляют устойчивость к указанным антибиотикам, но сохраняют чувствительность к 16-членным макролидам и линкозамидам. В связи с этим, в клинической практике могут встречаться стафилококки устойчивые как ко всем макролидам и линкозамидам, так и только к 14- и 15-членным макролидам.

У ряда микроорганизмов (*S. pneumoniae*, *Mycobacterium* spp., *Brachyspira hyodysenteriae*, *Propionibacterium* spp., *B. pertussis*, *H. influenzae*, *H. pylori*) известен и другой механизм модификации мишени для макролидов и линкозамидов – в результате мутаций в V домене 23S рРНК снижается сродство к антибиотикам и формируется клинически значимая устойчивость. При данном механизме наблюдают перекрестную резистентность ко всем макролидам и линкозамидам. Снижение чувствительности к макролидам/ линкозамидам штаммов *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *S. oralis* вызывают также мутации в генах рибосомальных белков L4 и L22.

Активное выведение. Активное выведение макролидов и линкозамидов осуществляют несколько транспортных систем. Основное клиническое значение имеет система выведения, кодируемая *mef*-геном, распространенная среди *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и многих других грамположительных бактерий. Соответствующий белок-транспортер выводит 14- и 15-членные макролиды и обеспечивает невысокий уровень резистентности (МПК 1–32 мг/л). Линкозамиды и 16-членные макролиды сохраняют активность.

Гены *mef* локализованы на хромосомах в составе конъюгативных элементов, что обеспечивает эффективное внутри- и межвидовое распространение. У стафилококков и энтерококков активное выведение макролидов, но не линкозамидов, осуществляют транспортные системы другого типа, кодируемые генами *msr*. Кроме того, существуют транспортные системы, осуществляющие избирательное выведение некоторых лекарственных препаратов, например, линкомицина или олеандомицина.

Ферментативная инактивация. Ферменты, инактивирующие макролиды и линкозамиды, описаны среди грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Некоторые из них обладают широким субстратным профилем (макролидфосфотрансферазы *E. coli* и *Staphylococcus* spp.), другие инактивируют только отдельные антибиотики (эритромицинэстеразы, распространенные среди семейства *Enterobacteriaceae*, линкомицинацети-

лтрансферазы стафилококков и энтерококков). При этом клиническое значение ферментов, инактивирующих макролидные антибиотики, невелико.

Роль отдельных механизмов резистентности к макролидам не равноценна. Получены данные о том, что при инфекциях, вызываемых *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* с устойчивостью, обусловленной активным выведением, некоторые макролиды могут сохранять клиническую эффективность.

В России устойчивость к макролидам и линкозамидам закономерно распространена среди MRSA. Среди метициллиночувствительных стафилококков частота устойчивости, как правило, не превышает 10%.

В последние годы в Европе наблюдается тенденция к росту устойчивости к макролидам среди *S. pyogenes* и *S. pneumoniae*, что связывают со значительным увеличением объема применения современных макролидов (азитромицина, кларитромицина, рокситромицина) в качестве лекарственных препаратов выбора для лечения инфекций ДП легкой степени. Однако, целесообразность такого расширения показаний вызывает дискуссии.

Надежные данные о многолетней динамике устойчивости *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* к макролидам в России отсутствуют. В Москве в период с 1998 г. по 2001 г. уровень устойчивости пневмококков к макролидам колеблется в пределах 8–12%, преобладающим механизмом является активное выведение. Устойчивость достигает 18%, во всех случаях она связана с активным выведением. Фиксируемый в последние годы уровень частоты устойчивости должен вызывать настороженность.

Тетрациклины

Активное выведение. Данный механизм является наиболее распространенным среди грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Детерминанты резистентности обычно локализованы на плазмидах, что обеспечивает их быстрое внутри- и межвидовое распространение. Часть генов и соответствующие белки (TetA – TetE) распространены среди грамотрицательных бактерий, другие (TetK, TetL) среди грамположительных.

Защита рибосомы. Известно семейство защитных белков, которые позволяют бактериям синтезировать белок, несмотря на связывание с рибосомой молекулы тетрациклина. Механизм подобной защиты неизвестен. Описано, по меньшей мере, 5 генов, кодирующих защитные белки, они распространены среди грамотрицательных и грамположительных бактерий и детерминируют устойчивость ко всем тетрациклинам.

Частота устойчивости к тетрациклинам среди клинически наиболее значимых микроорганизмов достаточно высока, что не позволяет рассматривать их как средства выбора для лечения большинства инфекций.

Гликопептиды

Модификация мишени действия. Механизм действия гликопептидов заключается в блокировании завершающей стадии синтеза пептидогликана путем связывания молекулы антибиотика с концевыми аминокислотами в боковой пептидной цепочке (D-аланин-D-аланин).

Механизм устойчивости к гликопептидам наиболее детально изучен у энтерококков, он связан с биосинтезом бактериями модифицированной боковой полипептидной цепи.

Известны три фенотипа устойчивости: VanA, VanB и VanC. Детерминанты устойчивости фенотипа VanA локализуются на плаزمиде, а фенотипа VanB – в основном на хромосомах. Для фенотипа VanA характерен высокий уровень устойчивости к ванкомицину и тейкопланину, для VanB – вариабельная резистентность к ванкомицину и чувствительность к тейкопланину. Фенотип VanC характерен для *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* и *E. flavescens*, проявляющих природно низкий уровень устойчивости к ванкомицину.

Устойчивость энтерококков к гликопептидам является серьезной проблемой в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) в США и Западной Европе. Чаще всего устойчивость отмечают у штаммов *E. faecium*, ее частота может достигать 15–20%. Достоверных данных о выделении ванкомицинорезистентных энтерококков (VRE) в России нет.

Сообщения о выделении единичных штаммов метициллинорезистентных и метициллиночувствительных *S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину (GISA) начали появляться в разных странах с 1997 г. Для штаммов со сниженной чувствительностью характерно утолщение клеточной стенки и уменьшение аутолитической активности. Обсуждается возможность избыточной продукции мишеней действия гликопептидов.

На практике при выделении ванкомицинорезистентных энтерококков и стафилококков необходимо тщательно проверять чистоту исследуемой культуры и точность ее идентификации. В частности, следует иметь в виду, что некоторые грамположительные бактерии (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp.) обладают природной устойчивостью к гликопептидам.

Сульфаниламиды и ко-тримоксазол

Сульфаниламиды и триметоприм (бактериостатический антибиотик, в основном использующийся для профилактики и лечения заболеваний мочевыделительной системы. Входит в список основных лекарственных средств ВОЗ. Принадлежит к семейству ингибиторов дигидрофолат-редуктазы) блокируют различные этапы одного метаболического пути бактерий – биосинтез фолиевой кислоты, благодаря этому между ними отмечается выраженный синергизм. Сульфаниламиды, являющиеся структурным аналогом парааминобензойной кислоты (ПАБК), являются конкурентными ингибиторами дигидроптератсинтетазы. Триметоприм подавляет активность дигидрофолатредуктазы.

Формирование метаболического шунта. Резистентность к триметоприму может являться результатом приобретения генов дигидрофолатредуктазы, нечувствительной (или малочувствительной) к ингибции, а устойчивость к сульфаниламидам – генов дигидроптеоратсинтетазы. Известно несколько типов каждого из устойчивых ферментов, но их происхождение полностью не ясно.

Гены ферментов, устойчивых к ингибированию, часто находятся в составе подвижных генетических элементов (транспозонов) в ассоциации с генами, детерминирующими устойчивость к другим антибиотикам.

Модификация мишени действия. Устойчивость может сформироваться и в результате мутаций в генах указанных ферментов.

Хлорамфеникол

Ферментативная инактивация (ацелирование) является основным механизмом устойчивости к хлорамфениколу. Гены ферментов – хлорамфениколацетилтрансфераз, как правило, локализуются на плазмидах и входят в состав транспозонов в ассоциации с генами устойчивости к другим противомикробным препаратам.

Полимиксины

Полимиксины оказывают бактерицидное действие на грамотрицательные бактерии, нарушая целостность цитоплазматической мембраны, действуя подобно поверхностно активным веществам (ПАВ). Приобретенная устойчивость отмечается редко.

Нитрофураны

Механизм действия нитрофуранов изучен недостаточно полно. Считается, что приобретенная устойчивость к данным лекарственным препаратам встречается очень редко, а о ее механизмах можно судить лишь предположительно.

Нитроимидазолы

Нитроимидазолы активируются в микробной клетке ферментом нитроредуктазой, возникающие при этом свободные радикалы повреждают ДНК бактерий. Устойчивость у подавляющего большинства анаэробных бактерий отмечается очень редко и не имеет практического значения.

Реальные проблемы возникают при развитии устойчивости у *H. pylori*, обусловленной инактивацией нитроредуктазы в результате мутаций в соответствующих генах.

1.2. Множественная устойчивость, связанная со снижением проницаемости

Снижение проницаемости внешних структур бактериальной клетки является наименее специфичным механизмом устойчивости и, обычно, приводит к формированию устойчивости одновременно к нескольким группам антибиотиков.

Чаще всего причиной данного явления становится полная или частичная утрата пориновых белков. Кроме того, относительно хорошо изучена система MAR (multiple antibiotic resistance – множественная устойчивость к антибиотикам). На фоне применения тетрациклинов или хлорамфеникола формируется устойчивость не только к этим антибиотикам, но и к β -лактамным антибиотикам и хинолонам. Активация MAR системы приводит к одновременному снижению количества одного из пориновых белков (*OmpF*) и повышению активности одной из систем активного выведения.

Снижение проницаемости за счет утраты или уменьшения количества пориновых белков встречается в ассоциации с продукцией β -лактамаз расширенного спектра. Утрата одного из пориновых белков (D2) *P. aeruginosa* приводит к избирательному снижению чувствительности микроорганизма кимипенему.

Возбудители внебольничных инфекций:

- ✓ *Staphylococcus* spp. – устойчивость к природным и полусинтетическим пенициллинам, связанная с продукцией β -лактамаз;
- ✓ *S. pneumoniae* – устойчивость различного уровня к пеницилину (часть штаммов устойчива к цефалоспорином III поколения), связанная с модификацией ПСБ; высокая частота ассоциированной устойчивости к макролидам, тетрациклинам, ко-тримоксазолу;
- ✓ *H. influenzae*, *M. catarrhalis* – устойчивость к полусинтетическим пенициллинам, связанная с продукцией β -лактамаз;
- ✓ *N. gonorrhoeae* – устойчивость к пенициллинам, связанная с продукцией β -лактамаз, устойчивость к тетрациклинам и фторхинолонам;
- ✓ *Shigella* spp. – устойчивость к ампициллину, тетрациклинам, ко-тримоксазолу, хлорамфениколу;
- ✓ *Salmonella* spp. – устойчивость к ампициллину, ко-тримоксазолу, хлорамфениколу. Появление устойчивости к цефалоспорином III поколения и фторхинолонам;
- ✓ *E. coli* – при внебольничных инфекциях мочевыводящих путей (МВП) – возможна устойчивость к ампициллину, ко-тримоксазолу, гентамицину.

Возбудители нозокомиальных инфекций:

✓ *Enterobacteriaceae* – продукция БЛРС (чаще всего среди *Klebsiella* spp.), обуславливающая клиническую неэффективность всех цефалоспоринов; очень высокая частота ассоциированной устойчивости к гентамицину/тобрамицину; в некоторых учреждениях тенденция к росту ассоциированной резистентности к фторхинолонам, амикацину;

✓ *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia* – ассоциированная устойчивость к цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам, иногда карбапенемам;

✓ *Enterococcus* spp. – ассоциация устойчивости к пенициллинам, высокого уровня устойчивости к аминогликозидам, фторхинолонам и гликопептидам;

✓ *Staphylococcus* spp. (метициллинорезистентные) – ассоциированная устойчивость к макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам, котримоксазолу, фторхинолонам.

1.3. Механизмы резистентности к противотуберкулезным препаратам

Особенности патогенеза туберкулеза и биологии возбудителя (медленная пролиферация, длительное персистирование в организме и последующая реактивация инфекции) накладывают определенные отпечатки на формирование устойчивости у микобактерий. Вследствие крайне ограниченных возможностей генетического обмена между микобактериями формирование у них резистентности практически всегда связано с накоплением хромосомных мутаций в генах, кодирующих мишени действия лекарственных препаратов.

Терминология антибиотикоустойчивости микобактерий отличается некоторыми особенностями, что связано с практическими задачами. Согласно рекомендациям ВОЗ, в зависимости от того, получал ли пациент специфическую противотуберкулезную терапию до выделения возбудителя, различают первичную и приобретенную устойчивость.

К микроорганизмам с первичной устойчивостью относят штаммы, выделенные от пациентов, не получавших специфическую терапию. В случае, если устойчивый штамм выделен у пациента на фоне противотуберкулезной терапии, то устойчивость расценивают как приобретенную.

В тех случаях, когда невозможно достоверно установить факт применения противотуберкулезных препаратов, используют термин «начальная» устойчивость. К множественноустойчивым микобактериям относят микроорганизмы, устойчивые, как минимум, к рифампицину и изониазиду.

Риск развития мутаций, опосредующих устойчивость, составляет: $3,32 \times 10^{-9}$ на одно деление клетки для рифампицина; $2,56 \times 10^{-8}$ – для изониазида; $2,29 \times 10^{-8}$ – для стрептомицина; $1,0 \times 10^{-7}$ – для этамбутола. Риск одновременного развития устойчивости к двум лекарственным препаратам меньше, чем 10^{-15} . Вероятность такого события очень низка, особенно учитывая тот факт, что обсемененность микобактериями очага инфекции обычно не превышает 10^8 КОЕ (показатель, указывающий на число образующих коло-

нии бактерий в 1 мл среды). Учитывая приведенные факты, формирование у микобактерий множественной устойчивости связывают с нарушением режимов антибактериальной терапии, хотя прямых доказательств этому нет.

С точки зрения природной чувствительности к АМП, микобактерии представляют собой не совсем однородную группу. Так, «атипичные» микобактерии *M. aviumintracellulare* устойчивы к изониазиду и пиразинамиду, микроорганизмы группы *M. chelonae* устойчивы к изониазиду, пиразинамиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу. Однако, с другой стороны, указанные микроорганизмы высокочувствительны к макролидам – азитромицину и кларитромицину, эти АМП составляют основу терапии соответствующих инфекций. Микроорганизмы группы *M. chelonae* также чувствительны к тетрациклинам и сульфаниламидам.

Рифамицины

Мишенью действия рифамицинов является фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза (ген *rpoB*). Устойчивость к рифамицинам (рифампицину, рифабутину и др.) в подавляющем большинстве случаев (более 95% штаммов) связана с мутациями в сравнительно небольшом фрагменте β -субъединицы данного фермента. Размер указанного фрагмента составляет 81 пару оснований (27 кодонов). Мутации в отдельных кодонах различаются по своему значению. Так, при мутациях в кодонах 526 и 531, обнаруживают высокий уровень резистентности к рифампицину (МПК < 32,0 мкг/мл) и другим рифамицинам. Мутации в кодонах 511, 516, 518 и 522 сопровождаются низким уровнем устойчивости к рифампицину и рифапентину, при сохранении чувствительности к рифабутину. В незначительной части случаев резистентность к рифамицинам связана с мутациями в других участках гена *rpoB*.

Изониазид

Изониазид по существу представляет собой пролекарство. Для проявления антибактериальной активности молекула лекарственного препарата должна быть активирована внутри микробной клетки. Однако, химическая структура активной формы изониазида окончательно не выявлена. Активация происходит под действием фермента каталазы-пероксидазы (ген *katG*). Мутации в этом гене (обычно в положении 315), приводящие к снижению активности фермента на 50%, обнаруживают приблизительно у половины изониазидорезистентных штаммов микобактерий.

Вторым механизмом устойчивости микобактерий к изониазиду является гиперпродукция мишеней действия активных форм лекарственного препарата. К таким мишеням относятся белки, участвующие в транспорте предшественников миколовой кислоты и ее биосинтезе: ацилированный белок-носитель (ген *acrM*), синтетаза (ген *kasA*) и редуктаза (ген *inhA*) белка-носителя. Миколовая кислота является основным компонентом клеточной стенки микобактерий. Мутации обычно выявляются в промоторных областях

указанных генов. Уровень устойчивости, связанной с гиперпродукцией мишеней, как правило, ниже, чем при мутациях в генах каталазы-пероксидазы.

Пиразинамид

Пиразинамид, как и изониазид, является пролекарством. После пассивной диффузии внутрь микробной клетки пиразинамид превращается в пиразиновую кислоту под действием пиразинамидазы (ген *pncA*). В свою очередь, пиразиновая кислота ингибирует ферменты биосинтеза жирных кислот. У 70–90% штаммов микобактерий, устойчивых к пиразинамиду, в структурных или промоторных областях пиразинамидазы обнаруживают мутации. Следует отметить, что *M. bovis* обладает природной устойчивостью к пиразинамиду, благодаря специфической точечной мутации в 169 кодоне.

Стрептомицин

В отличие от большинства других микроорганизмов, устойчивость микобактерий к аминогликозидам не связана с продукцией АМФ. У штаммов микобактерий, устойчивых к стрептомицину, обнаруживаются два вида мутаций, приводящих к модификации участка связывания антибиотика с малой субъединицей (23S) рибосомы: мутации в генах, кодирующих 16S рРНК (*rrs*), и генах, кодирующих S23 рибосомальный протеин (*rspL*).

Этамбутол

Мишенью действия этамбутола является белок *embB* (арабинозилотрансфераза), участвующий в биосинтезе компонента клеточной стенки микобактерий – арабиногалактана. Устойчивость к этамбутолу, в подавляющем большинстве случаев, связана с точечной мутацией в 306 кодоне.

Фторхинолоны

Механизмы устойчивости микобактерий к фторхинолонам не отличаются от механизмов, выявляемых у других микроорганизмов, и связаны с мутациями в генах ДНК-гиразы.

Макролиды

Устойчивость *M. aviumintracellulare* к макролидам определяется модификацией мишени их действия. У устойчивых штаммов обнаруживают замену аденина в 2058 положении молекулы 23S РНК.

При этом необходимо отметить, что механизмы резистентности части микобактерий к противотуберкулезным препаратам не установлены.

1.4. Механизмы резистентности к противогрибковым препаратам

Повышение роли грибов в этиологии госпитальных и некоторых внебольничных инфекций привело к внедрению в клиническую практику значительного числа новых лекарственных препаратов и их широкому применению, что, в свою очередь, неизбежно привело к формированию устойчивости. Поскольку грибы, в отличие от бактерий, являются эукариотическими организмами, то для лечения вызываемых ими инфекций необходимо использовать лекарственные препараты с принципиально другими мишенями и механизмами действия. Фактором, существенно затрудняющим изучение устойчивости грибов, является недостаточная стандартизация методов оценки их чувствительности к противогрибковым препаратам и трудности в обосновании критериев чувствительности.

Азолы

Механизм действия азолов (миконазол, кетоконазол, флуконазол, итраконазол и др.) заключается в ингибировании биосинтеза эргостерола – вещества, участвующего в поддержании структурной целостности мембраны клетки гриба. Основной мишенью действия азолов являются ферменты (14 α -деметилазы), осуществляющие деметилирование предшественников эргостерола. Для грибов рода *Candida* было показано, что устойчивость к азолам может быть связана с точечными мутациями, приводящими к аминокислотным заменам. В результате таких мутаций связывание ферментов с азолами резко снижается, при этом связывание с естественными субстратами не уменьшается. Устойчивость может являться результатом гиперпродукции мишеней действия азолов. У грибов рода *Candida* и др. известно несколько транспортных систем, осуществляющих активное выведение азолов, что также приводит к формированию их устойчивости. Активация систем выведения часто ассоциируется с изменениями в структуре мембраны, приводящими к снижению поступления азолов внутрь клетки гриба.

Аллиламины

Механизм действия аллиламинов (тербинафин), так же как и азолов, связан с ингибированием биосинтеза эргостерола. Однако, данная ингибиция происходит на существенно более ранних стадиях биосинтеза. В настоящее время зарегистрированы случаи неудач лечения тербинафином и описаны устойчивые штаммы. Генетические и биохимические механизмы устойчивости к аллиламинам изучены недостаточно. Однако показано, что лекарственные препараты могут активно выводиться из клеток грибов посредством известных транспортных систем.

Полиены

Механизм противогрибковой активности полиенов (нистатин, амфотерицин В и др.) заключается в физико-химическом взаимодействии данных лекарственных препаратов со стеролами цитоплазматической мембраны грибов. В результате такого взаимодействия в мембране образуются поры, через которые происходит потеря цитоплазматического содержимого, приводящая к гибели гриба. Поскольку мишенью действия полиенов являются структурные элементы клетки грибов, а не ферменты, то формирование устойчивости может быть результатом сложных генетических процессов, приводящих к изменению биосинтеза компонентов мембраны. Вероятность таких событий относительно невелика, с чем и связана низкая частота устойчивости к полиенам. Биохимия и генетика устойчивости к полиенам изучена недостаточно. Однако, имеющиеся данные в целом поддерживают гипотезу о снижении содержания эргостерола в цитоплазматической мембране и о повышении содержания его аналогов в устойчивых штаммах.

Оценка чувствительности к противогрибковым препаратам

В связи с появлением случаев неэффективности противогрибковой терапии возникла практическая потребность в определении чувствительности грибов к соответствующим лекарственным препаратам. К сожалению, возможности для решения данной задачи очень ограничены.

В качестве стандартного метода рассматривают метод серийных разведений на среде RPMI 1640, воспроизводимые результаты обеспечивают ряд других методов и некоторые коммерческие тест-системы.

Принципиальными моментами являются:

- ✓ отсутствие фузионного метода для оценки чувствительности грибов;
- ✓ отсутствие критериев интерпретации результатов исследований для большинства комбинаций гриб – лекарственный препарат;
- ✓ клинически обоснованные критерии разработаны только для оценки чувствительности грибов рода *Candida* к азолам и некоторым другим антимикотикам.

Следует отметить, что использование нестандартизованных («домашних» или коммерческих) методов оценки чувствительности грибов может привести к получению заведомо ложных результатов и серьезным ошибкам при выборе лекарственных препаратов для лечения.

1.5. Механизмы резистентности к противовирусным препаратам

Противовирусная терапия по своей эффективности значительно уступает антибактериальной терапии. В основном это связано с трудностями в разработке специфических лекарственных препаратов вследствие очень тесной интеграции вирусного генома и генома хозяина (человека). До настоящего

времени лишь очень ограниченное число вирусных инфекций, в той или иной степени, поддается эффективной этиотропной терапии: герпетические и ЦМВ-инфекции, ВИЧ, некоторые вирусные гепатиты. В этой связи, основное клиническое значение имеет устойчивость к наиболее распространенным противовирусным препаратам – противогерпетическим и антиретровирусным. Основными механизмами устойчивости является формирование и селекция мутаций в генах, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме лекарственных препаратов, или являющиеся непосредственными мишенями действия лекарственных препаратов.

Типичным для противовирусных препаратов является формирование резистентности в процессе длительной терапии.

Противогерпетические препараты

Многие противогерпетические препараты проявляют активность в отношении цитомегаловирусов (ЦМВ) и других вирусов. Ацикловир – основной противогерпетический препарат – является аномальным аналогом нуклеозида гуанозина. Внутри инфицированной вирусом клетки ацикловир подвергается фосфорилированию под действием вирусной тимидинкиназы и клеточных фосфорилаз. Ацикловира трифосфат включается в растущие молекулы ДНК и блокирует их биосинтез. Кроме того, он является конкурентным ингибитором вирусной ДНК-полимеразы. Устойчивость к ацикловиру формируется в результате мутаций в вирусной тимидинкиназе.

Известны два типа мутаций: приводящие к дефициту тимидинкиназы и приводящие к снижению сродства фермента к ацикловиру. Штаммы вирусов герпеса, дефицитные по тимидинкиназе, проявляют значительно сниженную вирулентность и вызывают инфекции в основном у людей с иммунодефицитом.

Мутации в вирусной ДНК-полимеразе приводят только к умеренному снижению чувствительности вирусов герпеса к ацикловиру, клиническое значение такого снижения чувствительности окончательно не установлено.

Кроме ацикловира, в клинической практике используют валацикловир, а также фамцикловир и ганцикловир. Механизмы резистентности у них такие же, как и у ацикловира.

Антиретровирусные препараты

Среди антиретровирусных препаратов выделяют ингибиторы обратной транскриптазы и ингибиторы протеазы. Обратная транскриптаза катализирует синтез ДНК с матрицы вирусной РНК. Вирусная протеаза осуществляет расщепление функционально неактивных полипротеинов и получение отдельных протеинов, необходимых для сборки вирионов.

Исторически первым ингибитором обратной транскриптазы был аналог тимидина зидовудин (азидотимидин). К настоящему времени в РФ зарегистрированы и разрешены к медицинскому применению другие аналоги нук-

леозидов: диданозин, зальцитабин, ставудин и др. Внутри клетки под действием фосфорилаз аналоги нуклеозидов превращаются в трифосфаты, являющиеся конкурентными ингибиторами обратной транскриптазы. Кроме того, включаясь в цепь вирусной ДНК, препараты блокируют ее дальнейший биосинтез.

Резистентность ВИЧ к аналогам нуклеозидов формируется достаточно быстро. В этой связи, их используют в комбинации с лекарственными препаратами других классов. К настоящему времени описано большое количество мутаций в генах обратной транскриптазы, приводящих к формированию устойчивости. Некоторые из данных мутаций опосредуют избирательную резистентность к зидовудину или другим аналогам нуклеозидов, другие вызывают перекрестную устойчивость ко всем известным лекарственным препаратам.

Подавлять активность обратной транскриптазы могут и соединения, отличающиеся по химической структуре от нуклеозидов (невирапин). Они связываются с ферментом в участке, отличном от каталитического центра. Несмотря на то, что связывание ингибитора и фермента происходит вне активного центра, данный процесс приводит к подавлению каталитической активности. Описано около 10 различных мутаций в генах обратной транскриптазы, приводящих к формированию резистентности.

Устойчивость к ингибиторам протеазы (ампренавир, индинавир, ритонавир, саквинавир) также формируется достаточно быстро в результате мутаций в генах фермента, поэтому для монотерапии их не применяют. Известны мутации, опосредующие устойчивость к отдельным ингибиторам, а также вызывающие перекрестную устойчивость к нескольким лекарственным препаратам.

Следует еще раз отметить, что специфическая терапия ВИЧ-инфекции во всех случаях должна быть комбинированной и соответствовать разработанным строгим схемам, что позволяет предотвратить селекцию резистентности.

1.6. Механизмы резистентности к антипротозойным препаратам

Простейшие (*Protozoa*) представляют собой обширную и разнообразную по свойствам группу эукариотических микроорганизмов. Некоторые метаболические пути простейших сходны с таковыми у бактерий, этим объясняется наличие антипротозойной активности у таких антибактериальных препаратов, как нитроимидазолы и тетрациклины.

Рассмотрим механизмы устойчивости простейших к наиболее известным лекарственным средствам.

Противомалярийные препараты

Появление резистентности к противомалярийным препаратам во многом связано с их массовым применением в рамках кампаний по глобальной лик-

видации малярии, проводимых под эгидой ВОЗ. Наибольшее значение имеет распространение устойчивости среди *P. falciparum*, в меньшей степени, среди *P. vivax* к доступным и экономичным лекарственным препаратам массового применения: хлорохину и пириметамину/ сульфадоксину.

Частота устойчивости к хлорохину варьирует в различных географических регионах, в том числе и в пределах одной страны. Так, в Кении резистентность варьируется от 18% до 70%.

Резистентность к хлорохину связана с двумя процессами: снижением транспорта лекарственного препарата внутрь плазмодия и его активным выведением. Наиболее вероятным геном, ответственным за активное выведение хлорохина является *pfmdr* (*P. falciparum* multidrug resistance) – гомолог гена множественной лекарственной устойчивости млекопитающих. У резистентных штаммов выявляется или увеличение копийности данного гена, или точечные мутации. Кроме того, увеличение числа копий гена *pfmdr*, вероятно, опосредует устойчивость и к мефлохину. Генетические исследования свидетельствуют, что в формировании резистентности участвуют и другие неустановленные механизмы.

Резистентность к ингибиторам фолиевой кислоты формируется в результате мутаций в генах ферментов биосинтеза фолиевой кислоты: дигидроптероатсинтетазы и дигидрофолатредуктазы. С точечными мутациями в этих генах, а также в генах тимидилатсинтетазы связана устойчивость к препарату группы бигуанидов – прогуанилу.

Активное выведение, опосредуемое продуктом гена *pfmdr*, вероятно, является причиной феномена множественной устойчивости *P. falciparum* к противомаларийным препаратам.

Нитроимидазолы

Ряд простейших, прежде всего, *T. vaginalis*, *G. Lamblia* и *E. histolytica*, характеризуются анаэробным метаболизмом, во многом сходным с метаболизмом анаэробных бактерий. Чувствительность данных простейших к нитроимидазолам (прежде всего, к метронидазолу) объясняется способностью микроорганизмов к восстановлению нитрогруппы лекарственных препаратов и, в связи с этим, трансформации их в активную форму, повреждающую ДНК. Донором электронов, участвующим в активации нитроимидазолов, является ферредоксин. Устойчивость анаэробных простейших к нитроимидазолам связана со снижением уровня экспрессии ферредоксина и, следовательно, со снижением способности микроорганизмов активировать лекарственные препараты.

2. Пути преодоления антибиотикорезистентности

Потребность периодического обновления антибиотиков, применяемых в медицинской практике, обусловлена постепенным распространением в микробиоценозе вариантов резистентности к антимикробным препаратам. Постоянное

применение в клинической практике определенного географического региона конкретного антибиотика в течение 20–30 и более лет приводит к тому, что резистентные к нему штаммы начинают обнаруживаться все чаще.

Антибиотики, применяющиеся в медицинской практике, непосредственно с геномом микроорганизмов не реагируют, т.е. не являются мутагенами. Однако, в популяциях микроорганизмов происходят, хотя и очень редко, разнообразные спонтанные мутации отдельных генов, причины которых неизвестны. При этом образуются мутанты с измененными субклеточными структурами и отклонениями в метаболизме. Нормальные клетки, являясь результатом длительной эволюции, хорошо приспособлены к окружающим естественным условиям. Мутантные формы к таким условиям приспособлены значительно хуже и, спустя определенное время, после ряда генераций исчезают. В то же время, если сама окружающая среда изменилась, и эти изменения длительно сохраняются, то мутантные формы микроорганизмов могут оказаться лучше приспособленными к новым (изменившимся) условиям, что и объясняет распространение такого разнообразия антибиотикорезистентных форм.

Одни и те же антибиотики при их массовом и непрерывном применении играют роль селективных факторов отбора резистентных к ним мутантных микроорганизмов. В этом случае именно мутантные формы, обладающие резистентностью, реализуют свой потенциал развития. Исходные антибиотикочувствительные культуры такой возможности не получают даже в том случае, если скорость их размножения в свободной от антибиотиков среде выше, чем у мутантных форм. При этом спонтанные мутации – это отнюдь не единственный источник генов резистентности.

У продуцентов некоторых антибиотиков (аминогликозидов) существует ферменты, модифицирующие или трансформирующие молекулу собственного антибиотика, что впоследствии приводит к его инактивации. Гены, кодирующие ферменты инактивации, могут включаться в ДНК некоторых фагов, а иногда в плазмиды, и переносятся из продуцентов в клетки патогенных и непатогенных бактерий.

В этой связи, попадание генов резистентности в патогенные микроорганизмы предопределено существованием в биоценозах самих продуцентов антибиотиков.

Существуют прямые доказательства того, что гены резистентности к антибиотикам и, соответственно, разные механизмы такой резистентности существовали до конца 50-х гг. XX в., т.е. до того времени, когда стали применяться пенициллин, стрептомицин, левомицетин, тетрациклины и др.

Музейные коллекции культур бактерий, хранившиеся с конца XIX в. и не соприкасающиеся с лекарственными препаратами антибиотиков (музейные культуры пересеваются 2–3 раза в год в боксах с особыми предосторожностями), содержат, хотя и редко, варианты, устойчивые к тем или иным антибиотикам. В частности, у таких культур обнаружены гены, кодирующие образование β -лактамаз.

Еще одно доказательство изначального существования генов антибиотикорезистентности было получено микробиологами в 60-х гг. XX в. в труднодоступных районах планеты, в которых местное население еще не соприкасалось с антибиотиками (верховья Амазонки, острова Полинезии). Из кишечной микрофлоры аборигенов, хотя и очень редко, но выделяли штаммы с генами резистентности, обуславливающими образование β -лактамаз или ферментов, инактивирующих антибиотики аминокликозидной структуры.

Все перечисленные факторы свидетельствуют, что полностью избавиться от генов антибиотикорезистентности теоретически невозможно, но частоту их распределения можно минимизировать. Изъятие антибиотика из клинической практики будет означать уменьшение распространенности к нему генов резистентности. Через определенное время антибиотик и близкие к нему лекарственные препараты восстановят свою терапевтическую эффективность и могут быть возвращены в медицинскую практику. Так, в США ставший малоэффективным стрептомицин, был вытеснен из клинической практики гентамицином, амикацином, полусинтетическими β -лактамными антибиотиками и другими новыми антибиотиками. В небольших городах, не являющихся транзитными пунктами для большого количества людей, стрептомицин восстановил свою эффективность спустя примерно 20 лет после прекращения его применения. В Нидерландах было запрещено использование тетрациклина в животноводстве в виду широкого распространения тетрациклинорезистентных сальмонелл. Уже спустя 5 лет частота встречаемости этих бактерий в стране снизилась в 2 раза, а применение тетрациклина при пищевых отравлениях стало в 2 раза более эффективным.

Общая стратегия борьбы с антибиотикорезистентностью может заключаться в последовательной замене одних лекарственных препаратов другими с возвращением «старых» лекарственных препаратов в практику через определенный срок. Такая «цикличность» быстрее приведет к необходимым результатам, если она будет соблюдаться в крупных географических регионах.

В настоящее время в клинической практике ассортимент антибиотиков и других антимикробных препаратов не позволяет эффективно полностью заменять одни группы антибиотиков другими. Однако, при условии получения ряда новых групп антибиотиков принцип цикличности может быть реализован. В этом случае постепенно произойдет значительное уменьшение генов резистентности к представителям временно исключенных из клинической практики групп антимикробных препаратов.

В этой связи, не только эффективность лечения, но и возвращение к экологическому равновесию в окружающей человека микрофлоре требует усиления работы в области создания методами биологического и органического синтеза антибиотических препаратов с новыми механизмами действия.

Значительное число исследований посвящено разработке методов подавления межбактериальной передачи резистентности к антибиотикам. Установлено, что некоторые антибиотики (стрептомицин, неомицин, рифампицин, полимиксин), нитрофурановые препараты (фурагин, фуразолин), пиронин, кофеин и др. препятствуют передаче трансмиссивной устойчивости к

антибиотикам. Одновременно с этим осуществляются исследования, направленные на разработку способов преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Учитывая, что хромосомный и плазмидный тип резистентности микроорганизмов к антибиотикам обусловлен субклеточными молекулярными структурами, состоящими из ДНК, представляется возможным применение ДНК-тропных соединений, обладающих свойством элиминировать R- и RTF-факторы или необратимо нарушать генетические функции бактериальной хромосомы. Такими свойствами обладают хинакрин, акрифлавин, митомицин С и др. Принимая во внимание то обстоятельство, что у резистентных бактерий снижается способность поглощать антибиотики, предприняты попытки изменить чувствительность к ним бактерий за счет одновременного применения мембранотропных и поверхностно-активных веществ, способных увеличивать проникновение антибиотиков в микробную клетку. Среди исследованных веществ наиболее перспективными оказались протамин, гистоны, имидазолин, а также антибиотики микробомитин и флавомицин. Кроме того, целесообразен поиск веществ, повышающих чувствительность к антибиотикам белоксинтезирующей системы бактерий. В частности, отмечено, что протамин гидрохлорид снижает резистентность бактерий к хлорамфениколу.

Большое внимание исследователи разных стран уделяют изучению возможности подавления выделяемых бактериями ферментов, инактивирующих β -лактамы антибиотики, аминогликозиды, хлорамфеникол. Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что наиболее активно угнетают пенициллиназы или элиминируют пенициллиназные плазмиды анионные детергенты (сульфанол) и 3,6-диаминоакридинные (профлавин, акрифлавин) производные антибиотиков. Кроме того, обнаружены вещества, подавляющие процесс инактивации хлорамфеникола: производные трифенилметанового ряда, протамин гидрохлорид, пенициллин.

Несомненно, что проведенные исследования послужат основой для разработки приемлемых и эффективных методов борьбы с антибиотикорезистентностью штаммов микроорганизмов. В настоящее время практически проблема повышения эффективности антибиотиков решается несколькими путями, наиболее эффективны из которых следующие:

- ✓ поиск новых природных антибиотиков, эффективных против заболеваний, вызываемых резистентными штаммами микроорганизмов;
- ✓ получение новых лекарственных препаратов с лучшими противомикробными фармакокинетическими параметрами в результате направленной химической трансформации молекул природных антибиотиков;
- ✓ применение сочетаний двух или нескольких антибиотиков с разными механизмами противомикробного действия или антибиотиков с другими лекарственными веществами для того, чтобы затруднить развитие резистентности у возбудителей заболевания и снизить токсичность отдельных компонентов за счет уменьшения дозы каждого из них..