

УДК615.33:579.61

АНТИБИОТИКИ. КОНЕЦ ЭПОХИ?

П. А. Дьяченко, канд. мед. наук,
Г У «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней
им. Л. В. Громашевского АМН Украины», г. Киев,
E-mail: ag_dyachenko@list.ru

Устойчивость к антибиотикам у бактерий возникает в результате двух основных механизмов: селекции естественно возникающих резистентных мутантов и горизонтального переноса детерминант резистентности. Исследования возникновения и диссеминации устойчивости к антибиотикам позволяют пролить новый свет на важную проблему клинической медицины, касающуюся лечения инфекций, вызываемых резистентными к антибиотикам патогенами. Очевидно, что природная микробиота даже в свободной от антибиотиков среде обладает огромным по количеству и разнообразию резервуаром генов резистентности, подобным тем, которые циркулируют в патогенной микрофлоре. Понимание сложной картины эволюции и экологии антибиотиков и резистентности к ним может помочь в разработке новых антибиотиков и контроле резистентности.

Ключевые слова: антибиотики, резистентность к антибиотикам, горизонтальный перенос генов.

Антибиотики (АБ, от греческого anti – против, bios – жизнь) – это низкомолекулярные вещества биологического происхождения, а также их полусинтетические производные, способные убивать микроорганизмы или подавлять их рост и размножение.

Хотя явление антагонизма и антибиоза среди микроорганизмов известно давно, безусловный приоритет в открытии собственно антибиотиков как клинически значимого класса противомикробных препаратов принадлежит Александру Флемингу, который в 1928 г. в фильтрате бульонной культуры зеленого плесневого грибка *Penicillium notatum* обнаружил вещество, способное тормозить рост штаммов *Staphylococcus aureus* и даже лизировать появившиеся колонии [1]. Это вещество было названо пенициллином по названию грибка-продуцента. Лишь в 1940 г. был найден метод выделения и очистки пенициллина, в ходе клинических испытаний доказана его высокая эффективность, а в 1943 г. развернуто широкомасштабное промышленное производство в США и Великобритании. В развитии медицины наступила новая эра (рис.1).

Необычайная клиническая эффективность в лечении множества инфекционных болезней закрепила за антибиотиками статус «чудо-лекарства», стимулировав активный поиск новых АБ, который продолжается и поныне. Вскоре после второй мировой войны была расшифрована структура пенициллина, что открыло путь к созданию его модифицированных производных. В 1944 г. Waksman открыл стрептомицин, оказавшийся весьма эффективным при лечении туберкулеза [2]. Полученные в 1947 г. хлорамфеникол (Ehrlich) и в 1948 г. хлортетрациклин (Duggar) показали высокую активность в борьбе с большинством грамположительных и грамотрицательных

микроорганизмов. Наступил «золотой век» медицины. Ежегодно исследователи выделяли и изучали около 20 новых АБ, не считая модификаций и клонов, и сейчас список известных АБ превышает 6000 наименований. Однако в клинической практике используются лишь 2-3 % из них, поскольку часть АБ оказалась весьма токсичной, другие, напротив, слабо эффективными.

Все АБ подразделяются на бактерицидные, которые убивают бактерии с эффективностью 99,9 %, и бактериостатические, которые лишь подавляют рост микроорганизмов [3] (Pankey and Sabath, 2004). Классификация АБ по механизму действия основана на взаимодействии препарата с мишенью внутри бактериальной клетки, результатом которого является ингибирование клеточной функции вплоть до гибели бактерии. Основными мишенями бактерицидных АБ в бактериальной клетке являются внешняя мембрана (синтез пептидогликана и других компонентов), репликация и репарация ДНК (интеркаляция) и ферменты синтеза), синтез белка (транскрипция и трансляция). Бактериостатические препараты действуют, как правило, на уровне трансляции, подавляя функцию как 30S (семейство тетрациклинов и аминоциклитолов), так и 50S (макролиды и хлорамфеникол) субъединиц рибосом (табл. 1). Группа аминоциклитолов, включающая бактерицидное семейство аминогликозидов и бактериостатический препарат спектиномицин, является единственным классом АБ, вызывающим ошибки транскрипции.

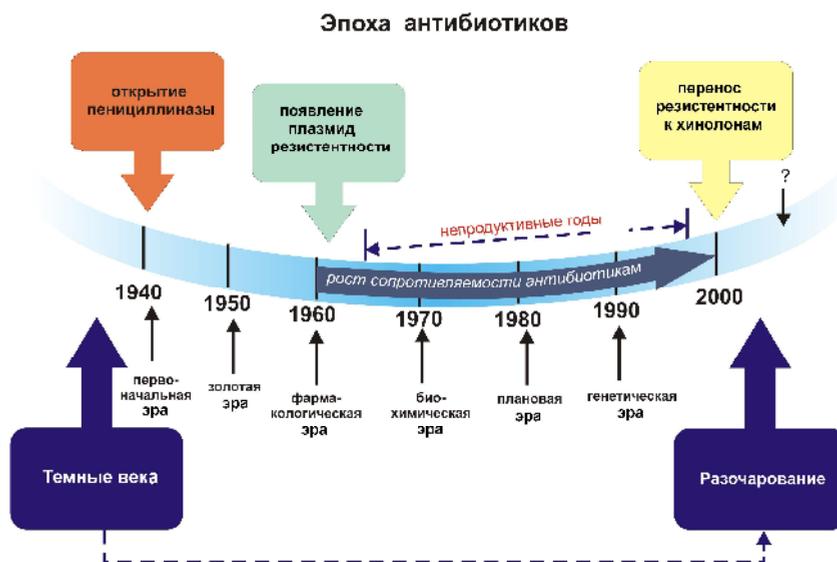


Рисунок 1 – История открытия АБ и развития резистентности [4] (Davies J., Davies D., 2010)

Недавно было установлено, что бактерицидный эффект трех основных классов бактерицидных АБ независимо от мишени действия у грамотрицательных и грамположительных бактерий реализует общий сценарий, связанный с образованием активных форм кислорода и прежде всего высокотоксичных гидроксильных радикалов. Последние вызывают двухнитчатые разрывы ДНК, что и приводит к гибели микроорганизмов. Гидроксильные радикалы являются конечным продуктом метаболической цепи, включающей цикл трикарбоновых кислот, временную деплецию NADH, дестабилизацию кластеров Fe-S и индукцию реакции Фентона (образование гидроксильных радикалов посредством восстановления перекиси водорода ионом железа) [5] (Kohanski et al., 2007). Возможно,

это не единственный механизм, лежащий в основе действия АБ. Действительно, под действием АБ в клетке развивается окислительный стресс, который приводит к появлению активных форм кислорода, одним из главных результатов чего является окисление гуанина из пула предшественников НК до 8-оксигуанина (8-охо-dG) [6] (Foti et al., 2012). Далее модифицированное основание встраивается в ДНК. В ходе контроля синтезированной цепи ДНК репараза DinB (ДНК-полимераза IV) вырезает нелегитимные нуклеотиды, восстанавливая правильную последовательность. Однако при большом количестве мутантных гуаниновых оснований DinB не успевает восстанавливать структуру ДНК, оставляя после себя летальные двухнитчатые разрывы. Цитотоксичность некоторых других АБ (аминогликозидов) может быть к тому же следствием неверной транскрипции (включение 8-оксигуанина, 8-охо-G) во вновь синтезируемую РНК.

Успехи антибактериальной терапии в сочетании с вакцинопрофилактикой инфекций и широкомасштабными противоэпидемическими мероприятиями привели к формированию в научной среде и обществе иллюзорного представления о скорой и окончательной победе над инфекционными болезнями. Эта уверенность была так велика, что главный хирург (Surgeon General) Вильям Стюарт, выступая в 1969 г. в Конгрессе США, заявил даже, что пришла пора «закрыть книгу инфекционных болезней» [7] (цит. по Сидоренко, Тишков, 2004). Однако реальность оказалась несколько иной. Ожидания, связанные с появлением АБ, осуществились лишь частично, «золотая пуля» так и не была получена, зато появилась и широко распространилась среди клинически значимых патогенов устойчивость к АБ, что, по сути, вернуло клиническую медицину в до АБ эру. На смену эйфории 40-50-х гг. прошлого века пришел скепсис, а затем и разочарование.

Первый тревожный сигнал прозвучал в 1940 г., т. е. еще до начала масштабного получения и широкого клинического применения пенициллина, когда появились сведения о бактериальной пенициллиназе [8] (Abraham, Chain, 1940). Уже в 1945 г. у больного туберкулезом, которого лечили стрептомицином, был обнаружен штамм *M.tuberculosis*, устойчивый к действию этого АБ. В дальнейшем с появлением каждого нового АБ появлялись устойчивые к ним штаммы. В середине 50-х годов XX века было обнаружено, что детерминанты резистентности могут передаваться горизонтально. Вначале это сообщение было воспринято скептически, однако очень скоро горизонтальный перенос генов резистентности (R) стал неоспоримым фактом. Вскоре пенициллин и другие АБ, а также устойчивые к ним бактериальные штаммы распространились по всему миру, одновременно вызвав волну исследований причин появления резистентности. Любопытная история связана с появлением резистентности к фторхинолонам (ФХ). При появлении нового мощного класса АБ в 1989 г. ряд экспертов высказал мнение о малой вероятности развития резистентности к ингибиторам гиразы, поскольку для этого необходимо, по меньшей мере, две мутации. Отрицалась и возможность горизонтального переноса устойчивости к ФХ. Однако уже вскоре были обнаружены мутантные гены бактериальной гиразы и эффлюкс-насосы, удаляющие АБ из клетки. Более того, механизм развития резистентности к ФХ стал передаваться латерально.

Одна из последних баз данных, основанных лишь на опубликованных последовательностях бактериальных геномов, содержит список из более чем 20000 генов резистентности почти 400 различных типов. Были обнаружены различные наборы детерминант резистентности и получены исчерпывающие доказательства переноса механизмов, обеспечивающих резистентность, между различными патогенными микроорганизмами [9]

(Walsh, 2000). Селекция резистентных к АБ штаммов была ускорена неблагоприятными врачебными назначениями и массовым распространением самолечения даже незначительных недугов. Особо значимую роль в распространении АБ-резистентности сыграло использование субтерапевтических доз АБ в качестве факторов роста в птицеводстве и животноводстве [10] (D'Costa et al., 2007). Широкое распространение в мире устойчивости бактерий к АБ и особенно множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) является главной причиной ренессанса инфекционных заболеваний. Приобретенная резистентность к противомикробным препаратам приводит к повышению заболеваемости и смертности, резко повышает стоимость лечения и, что, пожалуй, самое важное, индуцирует появление новых патогенов с непредсказуемыми свойствами.

Микроорганизмы владеют большим арсеналом механизмов, позволяющим им преодолевать действие противомикробных веществ. Среди основных: нейтрализация АБ посредством его модификации (гидролиз, фосфорилирование, ацелирование, гликозилирование), активное удаление его из клетки (эффлюкс), изменение мишени, изменение проницаемости наружной мембраны (табл. 1).

Таблица 1 – Способ действия и механизм резистентности основных АБ

| Класс АБ | Представители | Мишень | Модель (и) резистентности |
|-------------------|---|--------------------------|--|
| -Лактамы | Пенициллины, цефалоспорины, пенымы, монобактамы | Биосинтез пептидогликана | Гидролиз, эффлюкс, изменение мишени |
| Аминогликозиды | Гентамицин, стрептомицин, спектиномицин | Трансляция | Фосфорилирование, ацелирование, эффлюкс, изменение мишени |
| Гликопептиды | Ванкомицин, тейкопланин | Биосинтез пептидогликана | Репрограммирование биосинтеза пептидогликана |
| Тетрациклины | Тетрациклин, биомицин | Трансляция | Моноксигенация, эффлюкс, изменение мишени |
| Макролиды | Эритромицин, азитромицин | Трансляция | Гидролиз, гликозилирование, фосфорилирование, эффлюкс, изменение мишени |
| Линкозамиды | Клиндамицин | Трансляция | Эффлюкс, изменение мишени |
| Стрептограминны | Синерцид | Трансляция | С-О-лиаза (стрептограминны В типа), ацелирование (стрептограминны А-типа), эффлюкс, изменение мишени |
| Оксазолидоны | Линезолид | Трансляция | Эффлюкс, изменение мишени |
| Фениколы | Хлорамфеникол | Трансляция | Эффлюкс, изменение мишени |
| Хинолоны | Ципрофлоксацин | Репликация ДНК | Ацелирование, эффлюкс, изменение мишени |
| Пиримидины | Триметоприм | С1 Метаболизм | Эффлюкс, изменение мишени |
| Сульфонамиды | Сульфаметоксазол | С1 Метаболизм | эффлюкс, изменение мишени |
| Рифампицины | Рифампин | Транскрипция | АДФ-рибозилирование, эффлюкс, изменение мишени |
| Липопептиды | Даптомицин | Клеточная Мембрана | Изменение мишени |
| Катионные пептиды | Колистин | Клеточная Мембрана | Изменение мишени, эффлюкс |

Устойчивость к действию того или иного АБ бактерии могут обеспечивать несколькими способами одновременно. Селективное давление, создаваемое назначением АБ, может привести к появлению резистентности у ранее чувствительных резидентных штаммов или обеспечить доминирование в микробной популяции изначально

устойчивых штаммов. В общем устойчивость является результатом мутационных изменений или приобретения генетического материала, кодирующего резистентность. Детерминанты резистентности могут располагаться на бактериальной хромосоме или внехромосомно на мобильных генетических элементах (МГЭ). Подвижные R-гены легко переносят различные детерминанты резистентности и патогенности не только между бактериями одной и той же популяции, но и между родами бактерий. Несомненно, главную роль в формировании в природе резервуара АБ-резистентности играет человек. Тысячи тонн АБ попадают в биосферу, предоставляя селективные преимущества штаммам, несущим гены резистентности. Так, одна из фармацевтических компаний в центральной Индии сбрасывает в реку ежедневно свыше 50 кг ципрофлоксацина. Распространенность АБ-резистентности сейчас такова, что недавно R-гены были обнаружены в кишечной микрофлоре людей, живущих в изолированных ареалах вдали от цивилизации и никогда не использовавших АБ.

Недавние исследования показали, что большое число R-генов является компонентом геномов природной микробиоты. Это вызвало к жизни важный вопрос об экологической роли антибиотиков и АБ-резистентности. Не менее важной является проблема естественного или умышленного превращения тех или иных патогенов в мощное биологическое оружие в результате приобретения этими патогенами детерминант резистентности. Показано, например, что последовательность недавно изолированной конъюгативной плазмиды, которая детерминирует МЛР *Vibrio cholera*, на 99,99 % идентична последовательности конъюгативной плазмиды, ранее изолированной из МЛР-штамма возбудителя бубонной чумы *Yersinia pestis* [11] (Pan et al., 2008). Этот мобильный элемент обеспечивает устойчивость к 6 различным АБ, включая тетрациклин и хлорамфеникол, которые являются препаратами первой линии защиты против возбудителя чумы.

Происхождение АБ-резистентности

Появление и диссеминация устойчивых к АБ патогенов обусловлены, как правило, селекцией устойчивых вариантов, которая осуществляется в ходе различных генетических процессов: вырезания генов, рекомбинации, гетерологической экспрессии, ГПГ и мутагенеза. Последний сохраняет высокую значимость в развитии устойчивости к АБ у множества видов. Тем более, что развеяны некоторые заблуждения прошлого. К примеру, ранее считалось, что МЛР-штаммы в отсутствие селективного давления отличаются нестабильностью и коротким периодом существования. Однако эта точка зрения оказалась ошибочной. В одном из исследований в ходе 3-х месячного лечения ванкомицином больного с госпитальной инфекцией *S. aureus* было последовательно изолировано и идентифицировано 35 различных ванкомицин-резистентных мутантов [12] (Mwangi et al., 2007). Резистентность к АБ плейотропна по своему характеру. Однако фенотип устойчивости не обязательно возникает в ответ на селекцию АБ.

Известно, что штаммы устойчивых к АБ бактерий можно выделить, выращивая полученные из природных экосистем бактерии на среде, содержащей АБ. И это не удивительно, поскольку многие из этих бактерий (актиномицеты, стрептомицеты и др.) сами являются источниками получения АБ. Недавно Wright (2007) [13] провел скрининг коллекции спорообразующих актиномицетов на устойчивость к 21 различным АБ и обнаружил значительное число штаммов с естественной МЛР (в среднем к 7–8 АБ). Эти гены могут быть захвачены различными возбудителями и экспрессировать в них как детерминанты резистентности для любых интенсивно используемых ингибиторов.

Dantas и соавт. [14] (2008) проанализировали способность почвенных бактерий разрушать или инактивировать АБ. Среди сотен штаммов был обнаружен целый ряд изолятов, способных расти на одном или более из 18 различных АБ. Многие штаммы эффективно росли на аминокислотидах, ФХ и других классах АБ. Для некоторых из них АБ являлись единственным источником углерода и азота, т. е. пищей. Большинство из этих штаммов идентифицированы как протеобактерии, 40 % представляли *Burkholderia* spp., присутствовали также псевдомонады. Напрашивается вывод, что почвенные бактерии являются источником генов АБ-резистентности. Отсюда следует, что отличающийся большим разнообразием функциональный репертуар R-генов в микробиоме человека обусловлен обитающими в кишечнике сапрофитными почвенными бактериями [15] (Sommer et al., 2010). Используя новые технологические подходы, удалось в микробиоме здоровых людей выявить сотни ранее неизвестных R-генов, которые, к тому же, имели очень низкую степень гомологии (в среднем 60,7 % по нуклеотидному составу и 54,9 % по аминокислотному) с R-генами, выделенными ранее из патогенных микроорганизмов [16] (Sommer et al., 2009). Вставки ДНК, содержащие эти детерминанты резистентности, происходят в основном из представителей отрядов Bacteroidetes и Firmicutes [17] (McHardy et al., 2007). Эти отряды доминируют в кишечном микробиоме (> 90 %), причем лишь около 20 % бактерий из них являются облигатными анаэробами, которые растут на обычных питательных средах, в то время как большую часть (примерно 80 %) не удается культивировать при обычных условиях [18] (Eckburg et al., 2005). В состав Bacteroidetes входят такие важные патогены, как *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Ряд других патогенов, включая эпидемические штаммы *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* and *Haemophilus influenzae*, относится к легкокультивируемым факультативно анаэробным протеобактериям. Протеобактерии составляют не более 1 % всего кишечного микробиома человека [18] (Eckburg et al., 2005), однако их количество резко возрастает при лечении АБ за счет нормальной микрофлоры, что говорит об устойчивости протеобактерий к действию АБ [19,20] (Antonopoulos et al., 2009; Young, Schmidt, 2004). Важно подчеркнуть, что эти гены вполне доступны для патогенных бактерий. Об общем источнике происхождения генов резистентности в микробиомах кишечника свидетельствует тот факт, что в сапрофитной аэробной микрофлоре двух неродственных здоровых людей свыше 65 % R-генов практически идентичны по нуклеотидным последовательностям (>90 %) генам, имеющимся в базах данных [15] (Sommer et al., 2010), но лишь менее 10 % генов резистентности, выявленных в некультивируемых бактериях, имели близкие аналоги у здоровых людей и в базах данных. Идентичность R-генов из культивируемого микробиома кишечника человека и патогенной микрофлоры подчеркивает их тесную эволюционную связь. Очевидно, что окружающая микробиота даже при полном отсутствии АБ антропогенного происхождения содержит огромный резервуар разнообразных мобильных R-генов, которые попадают в кишечник человека при его заселении сапрофитной микрофлорой вскоре после рождения. Этот резервуар доступен патогенным бактериям, попадающим в кишечник. Культивируемые изоляты могут переносить детерминанты устойчивости к АБ ранее чувствительным штаммам *in vivo*. Носители детерминант резистентности к АБ в составе человеческого микробиома могут, в свою очередь, превратиться в патогенные штаммы, приобретя вирулентные гены от патогенов, попавших в кишечник человека, что и происходит в некоторых случаях. Таким образом, МЛР микробиом человека содержит

большой резервуар генов, который может служить донором генов АБ-резистентности и реципиентом факторов вирулентности либо быть перmissive средой для дремлющих патогенов.

Этот факт трудно объяснить с антропоцентрической позиции, фиксирующей внимание на клинических аспектах применения АБ, таких, как эффективность лечения инфекций и появление устойчивых к АБ патогенов. С дарвинистских позиций АБ, похоже, представляют собой часть сигнальной системы, эволюционировавшей в разных экосистемах для обмена информацией внутри отдельных популяций/микробиомов и между ними. Такие сигналы в субпороговых, доклинических концентрациях стимулируют фенотипические и генотипические ответы микробиоты и других членов сообщества [21] (Aminov, 2009). В любом случае штамм-продуцент антибиотиков одновременно производит средство самозащиты от него. Похоже, что до начала эры антибиотиков гены резистентности были атрибутом только сапрофитной, но не патогенной микрофлоры, для которой человек и другие позвоночные являются главной или даже единственной средой обитания.

Конъюгативные плазмиды и супергеном

За время своего существования прокариоты развили уникальные и эффективные механизмы модификации геномов, которые позволяют им адаптироваться практически к любым изменениям условий существования и колонизировать плейотропные экологические ниши. В отличие от эукариотов генетические изменения и пролиферация у прокариотов – процессы независимые. Это означает, что часть прямых мутагенных изменений в бактериальных геномах не передается вертикально, т. е. не наследуется. Модификация их геномов осуществляется посредством потери или приобретения генов через механизм горизонтального переноса генов (ГПГ). Приобретенные таким образом новые гены встраиваются в геном с помощью мобильных генетических элементов (МГЭ), таких, как плазмиды, фаги, транспозоны, или посредством прямого проникновения в бактериальную клетку и встраивания фрагментов ДНК. Механизм ГПГ является адекватной заменой половой рекомбинации, присущей эукариотам. Более того, этот механизм позволяет преодолевать границы даже между *Bacteria* и *Archaea*. Анализ 20000 генов из геномов 8 свободно живущих прокариотов показал, что ГПГ в 10000 раз ускоряет получение бактериями новых генов [22] (Jain et al., 2003). Исследования показали, что факторы патогенности или устойчивости к противомикробным средствам часто приобретаются посредством переноса геномных островов (ГО), содержащих эти детерминанты [23] (Dobrindt et al., 2004). Можно утверждать, что горизонтальный транспорт генов является универсальным свойством бактерий и важнейшим инструментом микробной эволюции. И не только микробной. В человеческом геноме, содержащем примерно 35000 генов, обнаружено порядка 400-500 геномов ретровирусов и свыше 65000 последовательностей бактериального происхождения. Недавно были получены первые свидетельства возможности обратного процесса: в геноме гонококка был обнаружен небольшой фрагмент ДНК человека, функционально связанный с интеграцией интервентных последовательностей [24].

Однако еще более важна роль бокового транспорта в эволюции и функционировании прокариотических сообществ. ГПГ формирует широкую сеть интенсивных потоков генов между членами этих сообществ. Недавние исследования показали, что значительная часть занимающего одну эконишу микробиома содержит МГЭ последовательности в виде фагов, профагов и плазмид, которые составляют общий, независимый от отдельных бактерий пул генов, т. н.

супергеном [25,26] (Venter et al., 2004; Tringe et al., 2005). Предложенная концепция супергенома предполагает, что эволюция специфических прокариотов тесно связана со средой, в которой они обитают, и с доступным резервуаром МГЭ в этой среде. Иными словами, каждый микробиом содержит пул генов (супергеном), легкодоступный всем членам этого микробного сообщества [27] (Norman et al., 2009). Супергеном состоит из частного пула фиксированных на бактериальных хромосомах генов и коммунального пула генов, кодируемых МГЭ (рис. 2).

При этом кассеты генов разного состава встраиваются через сайт-специфическую интеграцию в интегрон, который, в свою очередь, вставляется в переменные транспозоны. Последние интегрируют в транспортные системы типа конъюгативных плазмид (рис. 3), которые осуществляют перенос генетической информации в пределах коммунального пула генов. Конъюгативные плазмиды, как правило, имеют модульное строение, так как часто состоят из дискретных областей генов, которые собраны в функциональные группы и ответственны за различные аспекты существования и распространения плазмид.

Практически любые дополнительные генетические элементы способны приобретать и переносить R-гены. Тип транспортного элемента зависит от рода патогена. Несмотря на различия в транспортных системах грамположительных и грамотрицательных бактерий, они используют общий механизм ГПГ [27] (Norman et al., 2009). В то же время транспортная система на основе бактериофагов используется редко, хотя их элементы идентифицируются в различных векторах достаточно часто. ГПГ является наиболее общим транспортным процессом. Показано, например, что перенос генов в кишечнике человека осуществляется *ad libitum* [28] (Shoemaker et al., 2001).

По мнению ряда исследователей, плазмиды, переносящие гены резистентности к АБ, и полирезистентные штаммы бактерий эволюционировали относительно недавно. Однако анализ коллекции бактериальных патогенов, изолированных до начала «эры АБ», показал, что плазмиды были широко распространены и ранее, а гены резистентности были редкостью [29] (Datta, Hughes, 1983). Патогены в них просто не нуждались! Однако ситуация резко изменилась в результате массированного проникновения АБ в экосистемы и появления мощного селективного пресса, что привело к вымыванию из бактериальных популяций чувствительных к АБ штаммов и замене их резистентными. Фенотип, а в ряде случаев и генотип большинства патогенов, вызывающих наиболее распространенные инфекции человека, резко изменился. Произошел скачок в эволюции микромира. Бактерии иногда называют конечным, т. е. совершенным патогеном, но совершенны они не потому, что достигли вершины развития, а потому, что их способность изменяться, их пластичность достигли совершенства. Так что при возникновении дилеммы «измениться или погибнуть» бактерии всегда выбирают первое.

Важнейшим генетическим элементом, обеспечивающим встраивание или исключение импортированных генов, являются интегроны (рис. 4). АБ-гены устойчивости *gamma*proteobacteria переносятся в виде компактных наборов генов (кассет) и встраиваются в интегрон под высокоэффективный промотор [31] (Gillings et al., 2008). Недавно было показано, что захват генов и их экспрессия активируются SOS-системой [32, 33] (Guerin et al., 2009, 2010). На сегодня идентифицировано 3 класса интегронов, различающихся по генам, кодирующим фермент интегразу, и свыше 100 кассет генов, перекрывающих все основные классы АБ [34] (Recchia, Hall, 1995).

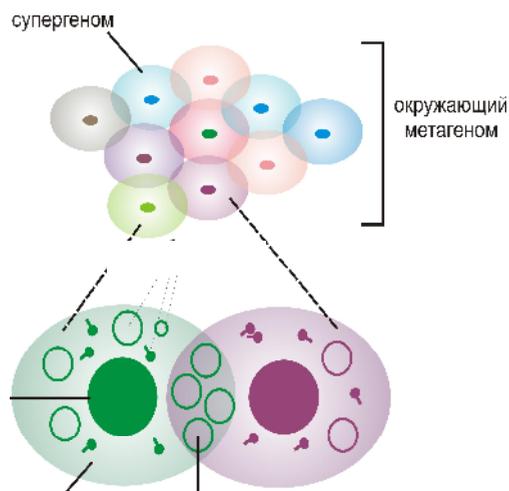


Рисунок 2 – Бактериальный супергеном состоит из хромосомных генов отдельных микроорганизмов и общего пула генов, кодируемых МГЭ [27] (Norman et al., 2009)

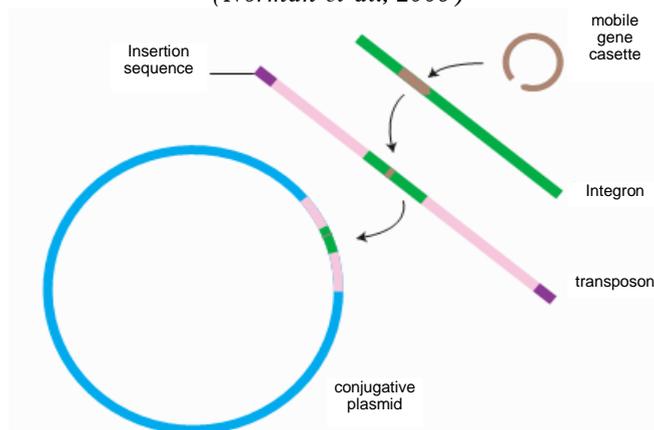


Рисунок 3 – Модульный характер и иерархия МГЭ [27] (Norman et al., 2009)

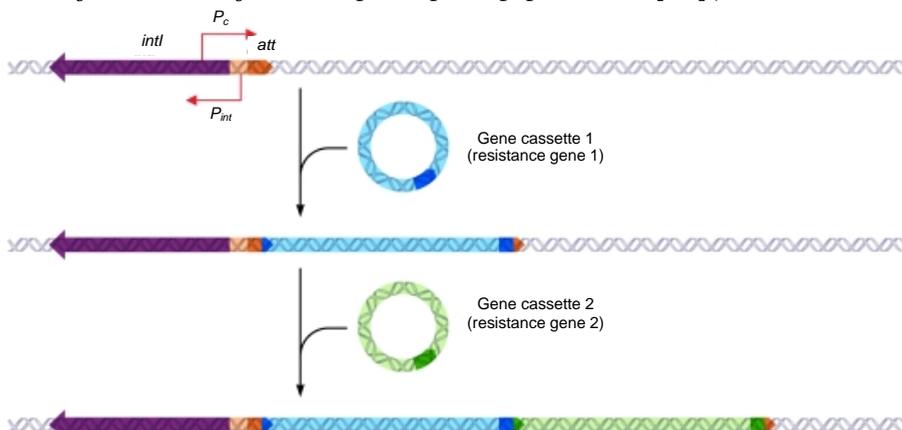


Рисунок 4 – Структура интегрона и механизм встраивания генов. В состав интегрона входит ген интегразы (*Int*) с промоторами *P_{int}* и *P_c* на 3' конце гена и участком встраивания (*attI*). Закольцованные интегразой кассеты генов встраиваются через рекомбинацию в указанный сайт, формируя структуру типа оперона. Далее происходит интенсивная транскрипция *R*-генов с эффективного *P_c*-промотора [30] (Stokes, Hall, 1989)

Удивительным оказалось обнаружение в природе огромного числа кассет интегронов, которые не кодируют какие-либо известные детерминанты резистентности [31] (Gillings et al., 2008). Иными словами, бактерии разработали систему защиты от оружия, которого еще нет в природе. Это созвучно клоновой модели иммуногенеза у позвоночных. В широком смысле очевидно, что интегроны и кассеты генов играют важную роль в эволюции бактериальных геномов и пластичности царства бактерий [35] (Boucher et al., 2007).

Недавняя вспышка в Европе энтероколита, вызванная STEC (редкий энтероагрегативный C227-11 штамм *Escherichia coli* O104:H4, продуцирующий шига-токсин 2), показала колоссальное значение бокового переноса детерминант патогенности при помощи конъюгативных плазмид. Даже незначительного количества попавших в пищеварительный тракт STEC оказывалось достаточно для запуска латентного процесса обмена плазмидами между STEC и непатогенными *E. coli* кишечника, что приводило к продукции большого количества токсина и развитию тяжелого гемолитико-нефротического синдрома. Гены, контролирующие синтез и высвобождение шига-токсина (*stxA*B2), находятся в области профага под контролем двух промоторов. Один из них, как оказалось, активируется ципрофлоксацином: добавление 25 нг/мл (рекомендованная терапевтическая концентрация в кишечнике) этого препарата в 80 раз повышает экспрессию этих генов [36] (Rasko, 2011). Понятно, что лечение больных ципрофлоксацином резко отягощало течение болезни.

Супербактерии и суперрезистентность

Многие бактериальные патогены, ассоциированные с эпидемическими болезнями, эволюционировали в МЛР-формы. Среди них *M. tuberculosis*, возбудители нозокомиальных инфекций – *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Serratia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae*. Вообще, термин «супербактерия» относится к микробам с повышенным уровнем заболеваемости и смертности, вызванным высокой устойчивостью к рекомендованным для их лечения АБ. Терапевтические возможности для инфекций, вызванных этими бактериями, ограничены, а длительность и стоимость лечения увеличены. В ряде случаев суперрезистентные штаммы приобретают повышенную вирулентность и трансмиссивность. Иными словами, АБ-резистентность может расцениваться как фактор вирулентности. Туберкулез является типичным примером супербактерии. Этот возбудитель инфицирует сейчас не менее трети всей мировой популяции. Если в 50-х годах XX века коктейли из противотуберкулезных препаратов оказывались весьма эффективными в лечении туберкулеза, то сейчас лечение 3-4 препаратами первой линии зачастую оказывается безрезультатным из-за появления крайне (XDR) и даже тотально (TDR) резистентных штаммов *M. tuberculosis*. Не доказано участие ГПГ в формировании МЛР у *M. tuberculosis*. Похоже, единственным механизмом ее возникновения являются спонтанные мутации.

У наиболее значимых грамотрицательных патогенов, таких, как *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, которые вызывают различные заболевания у человека и животных, отмечается строгая корреляция между использованием АБ для их лечения и АБ-резистентностью. Это прежде всего относится к классу -лактамовых АБ и инактивирующих их

ферментам, β -лактамазам. К настоящему времени идентифицировано несколько групп и классов этих ферментов, насчитывающих свыше 1000 наименований (рис. 5). Этот список включает также несколько новых классов генов и их мутантных производных. Гены, кодирующие β -лактамазу (TEM), переносятся древней плазмидой и чрезвычайно широко распространены в природе и микробном царстве. Источником новой β -лактамазы расширенного спектра действия (СТХ-М) является природный штамм *Kluyvera*. Этот появившийся в 90-х годах XX века фермент оказался способен расщеплять цефалоспорины широкого спектра действия на клинически значимом уровне. СТХ-М-гены и последующие варианты (уже обнаружено свыше 100 различных аминокислотных замещений) эффективно переносятся горизонтально. Вообще ГПП играет определяющую роль в эволюции и передаче устойчивости к β -лактамовым АБ среди энтеробактерий и кокков как в природе, так и при госпитальных инфекциях.

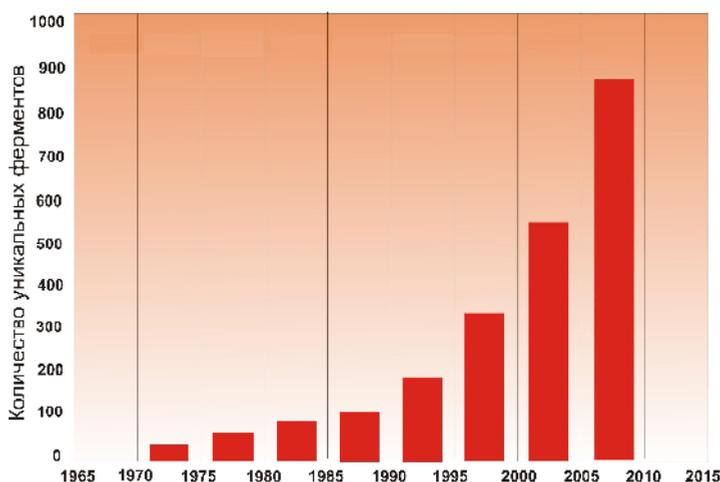


Рисунок 5 – Количество уникальных β -лактамаз, идентифицированных после появления первого β -лактамового АБ [37] (Bush, Jacoby, 2010)

Одной из наиболее значимых супербактерий является грамположительная бактерия *S. aureus*. Она тесно ассоциирована с человечеством: ее носителями (назальный комменсал) является не менее 30 % популяции. *S. aureus* вызывает множество заболеваний, и в последние годы считается главной причиной нозокомиальных инфекций. Применявшийся для лечения инфекций, вызванных *S. aureus*, пенициллин стал также первым модифицированным АБ, призванным игнорировать появление у стафилококков пенициллиназ (1959 г., метициллин). Однако уже через 3 года появились устойчивые к метициллину штаммы (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA). Недавно было установлено, что MRSA вышли за пределы больниц, превратившись в главный патоген окружающей среды с повышенной вирулентностью и трансмиссивными характеристиками (CA-MRSA). Последний сохранил гены MRSA и приобрел ряд новых, например, ген, кодирующий цитотоксический лейкоцидин. В результате акроним MRSA теперь расшифровывается как multiantibiotic-resistant *S. aureus*.

Еще одним серьезным госпитальным патогеном является *C. difficile*, которая вследствие продукции токсина стала гипервирулентной. Эта грамположительная спорообразующая бактерия легко переносится

больными, персоналом и в виде аэрозоля. Ее экспансия связана с массивным применением в больницах АБ расширенного спектра действия (цефалоспорины, фторхинолоны), вызывающих серьезное угнетение грамотрицательной кишечной микрофлоры, что способствует тем самым колонизации *S. difficile*. Таким образом, эта инфекция является прямым результатом применения АБ.

Супербактерии ныне повсеместно присутствуют в биосфере. Их появление усугубляет природные и антропогенные катаклизмы.

Стратегия противодействия и лечения

Несмотря на появление в клинике все более мощных АБ, заболеваемость и смертность от инфекционных болезней после десятилетий спада в последние годы повышается [38] (Jones, Phaller, 1998). Уже указывалось, что причиной этого является неадекватное применение АБ, приводящее к селекции устойчивых штаммов и элиминации резидентной микрофлоры, способной конкурировать с патогенными микроорганизмами, а также широкое использование АБ в сельском хозяйстве. В результате разработка и применение профилактических программ стали насущной необходимостью. Сердцевиной таких програм является существенное сокращение клинического использования некоторых АБ. Нужно помнить, что функции, которые не поддерживаются естественным отбором, постепенно исчезают. Например, распространение цефалоспоринов 3-го поколения привело к генерализованному развитию устойчивости к -лактамам у ранее чувствительной бактериальной популяции. Сокращение использования этих препаратов (а также имипенема и ванкомицина) с одновременным увеличением использования пенициллина широкого спектра и комбинированной терапии с участием аминогликозидов привело к частичному восстановлению бактериальной чувствительности [39, 40] (Fridkin et al., 2002; Rice et al., 1996). В Финляндии уменьшение на 40 % использования макролидов привело за 4 года к снижению резистентности стрептококка группы А с 16,5 % до 8,6 % [41] (Seppala et al., 1997), в Германии после прекращения использования авопарцина в качестве пищевой добавки на птицефермах содержание резистентных к ванкомицину энтеробактерий в кишечной микрофлоре здоровых людей снизилось за 4 года с 12 % до 3 % [42] (Klare et al., 1999). С другой стороны, чувствительность *Enterobacteriaceae* к стрептомицину не восстановилась даже через 20 лет после прекращения его клинического использования [43] (Chiew, 1998).

Правильная клиническая тактика применения АБ также является важным императивом предотвращения резистентности. Фактором риска является повторное назначение АБ в субоптимальных дозах. Сублетальные концентрации препарата приводят к селекции устойчивых штаммов патогенов, не убивая их.

Основываясь на фармакокинетике, противомикробные препараты можно разделить на две большие группы: концентрационно зависимые и концентрационно независимые. Действие препаратов первой группы, включающей фторхинолоны и аминогликозиды, критически зависит от их концентрации. Эффективность действия прямо пропорциональна концентрации. Для препаратов второй группы, которую составляют -лактамовые АБ, критически важна не высокая концентрация, а время сохранения минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Поэтому препараты первой группы, прежде всего аминогликозиды, следует назначать в максимально переносимых дозах. Эта тактика не применима для ФХ из-за возможного токсического эффекта на ЦНС. Возможным методом оптимизации лечения ФХ является назначение повышенных по сравнению с обычными доз препаратов или использование комбинаций АБ [44] (Nicolau et al., 1995). Целью лечения концентрационно независимыми

АБ является поддержание МИК в организме больного в течение длительного времени. Это особенно важно при лечении иммуносупрессированных пациентов и инфекций, патогены которых имеют высокие МИК. Удобным методом является непрерывная инфузия препаратов [44] (Nicolau et al., 1995). Безопасность метода подтверждена длительными инфузиями цефтазидима здоровым добровольцам и тяжелобольным пациентам [45] (Nicolau et al., 1996). Однако наиболее трудной задачей является эрадикация патогена, обладающего МЛР. В этом случае тактика лечения должна включать обязательную лабораторную характеристику детерминант резистентности и применение комбинаций АБ, для которых установлены минимальные значения МИК. Лечение должно быть длительным с регулярной сменой лекарственных коктейлей.

Анализируя факты удивительной генетической пластичности бактерий, можно прийти к неутешительному выводу: мощный пресс цивилизации в последние десятилетия привел к дестабилизации бактериальных геномов, что резко активизировало процесс образования новых видов и эволюции микромира в целом. Это утверждение можно иллюстрировать результатами нашего исследования. При анализе терморезистентности шигелл выяснилось, что 96 % архивных штаммов бактерий, изолированных в 50-60-х годах прошлого века, были чувствительны к температуре 70 °С при экспозиции в 1 мин (режим пастеризации молока). В то же время больше 80 % актуальных изолятов сохраняли жизнеспособность даже после 45 мин. прогревания при этой температуре. Почти 84 % актуальных штаммов шигелл Флекснера и 55 % актуальных штаммов шигелл Зонне сохраняли способность к размножению даже после прогревания при 90 °С в течение 20 с. Это свидетельствует об активации генов теплового шока (HSG) и, возможно, всего комплекса тревожных (SOS) генов [46] (Дьяченко А. Г. и др., 2004). Об этом же говорят все более частые случаи вспышек ранее неизвестных инфекций («птичий» грипп, калифорнийский грипп, атипичная пневмония, SARS, энтерогемолитический эшерихиоз и др.). Нет сомнений в том, что этот список будет продолжен. К сожалению, мы не можем предсказать, где появится новая угроза и каким будет ее характер. Очевидно, что эпидемию генов резистентности с эффективным ГПГ и быстрым развитием мутантных вариантов контролировать невозможно.

АНТИБИОТИКИ. КІНЕЦЬ ЕПОХИ?

П. А. Дьяченко, канд. мед. наук;

Д У «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України», м. Київ,

E-mail: ag_dyachenko@list.ru

Стійкість до антибіотиків у бактерій виникає в результаті двох основних механізмів: селекції резистентних мутантів, що природно виникають, і горизонтального перенесення детермінант резистентності. Дослідження виникнення і дисемінації стійкості до антибіотиків дозволяють пролити нове світло на важливу проблему клінічної медицини, що стосується лікування інфекцій, викликаних резистентними до антибіотиків патогенами. Очевидно, що природна мікробіота навіть у вільному від антибіотиків середовищі має величезний за кількістю і різноманітністю резервуар генів резистентності, подібним тим, які циркулюють у патогенній мікрофлорі. Розуміння складної картини еволюції та екології антибіотиків і резистентності до них може допомогти в розробленні нових антибіотиків і контролі резистентності.

Ключові слова: антибіотики, резистентність до антибіотиків, горизонтальне перенесення генів.

ANTIBIOTICS. THE END OF THE ERA?

P. A. Dyachenko,

State Institution "Institute of Epidemiology and Infectious Disease named after L. V. Gromashevskiy of Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kiev

Antibiotic resistance arises through mechanisms such as selection of naturally occurring resistant mutants and horizontal gene transfer. Investigations of antibiotic resistance from an environmental prospective sheds new light on a problem that was traditionally confined to a subset of clinically relevant antibiotic-resistant bacterial pathogens. It is clear that the environmental microbiota, even in apparently antibiotic-free environment, possess an enormous number and diversity of antibiotic resistance genes, some of which are very similar to the genes circulating in pathogenic microbiota. Understanding the complex picture of evolution and ecology of antibiotics and antibiotic resistance may help to understand the processes leading to the emergence and dissemination of antibiotic resistance and also helps to control it, at least in relation to the newer antibiotics now entering clinical practice.

Key words: antibiotic resistance, bacterial pathogens, environmental microbiota.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenza // *British J. Exp. Pathol.* – 1929. – Vol. 10. – P. 226–236.
2. Waksman S. A., Schatz A. Strain specificity and production of antibiotic substances. VI. Strain variation and production of streptothricin by *Actinomyces lavendulae* // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1945. – Vol. 31. – P. 208–214.
3. Pankey G. A., Sabath L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram – positive bacterial infections // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 38. – P. 864–870.
4. Davies J., Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2010. – Vol. 74(3). – P. 417–433. doi: 10.1128/MMBR.
5. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Hayete B. et al. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics // *Cell.* – 2007. – Vol.130. – P. 797–810.
6. Foti J. J., Devadoss B., Winkler J. A., Collins J.J., Walker G.C. Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics // *Science.* – 2012. – Vol. 336. – P. 315. DOI: 10.1126/science.1219192.
7. Сидоренко С. В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам/ Сидоренко С. В., Тишков В. И. // *Успехи биол. химии.* – 2004. – Т. 44. – С. 263–306.
8. Abraham E. P. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin /Abraham E. P., Chain E. // *Rev. Infect. Dis.* – 1940. – Vol. 10. – P. 677–678.
9. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance // *Nature.* – 2000. – Vol. 406. – P. 775.
10. D'Costa VM, Griffiths E, Wright GD. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 10. – P. 481.
11. *Vibrio cholerae* O139 multiple – drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202 – like conjugative plasmids / Pan J.C., Ye R., Wang H.Q. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol.52. – P.3829.
12. Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole – genome sequencing / Mwangi M. M., Wu S. W., Zhou Y., Sieradzki K. et al.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – Vol. 104. – P. 9451 – 9456.
13. Wright, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – Vol. 5. – P. 175–186.
14. Dantas, G., Sommer M. O. A., Oluwasegun R. D., Church G. M. Bacteria subsisting on antibiotics // *Science.* – 2008. – Vol. 320. – P. 100–103.
15. Sommer M. O. A., Church G. M., Dantas G. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes // *Virulence.* – 2010. – Vol. 1. – № 4. – P. 299–303.
16. Sommer M. O., Dantas G., Church G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora // *Science.* – 2009. – Vol. 325. – P. 1128–1131.
17. McHardy A. C., Martin H. G., Tsirigos A. et al. Accurate phylogenetic classification of variable – length DNA fragments // *Nat. Methods.* – 2007. – Vol. 4. – P. 63–72.
18. Eckburg P. B., Bik E.M., Bernstein C. N. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora // *Science.* – 2005. – Vol. 308. – P. 1635–1638.
19. Antonopoulos D. A., Huse S. M., Morrison H. G. et al. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77. – P. 2367–2375.
20. Young V. B., Schmidt T. M. Antibiotic – associated diarrhea accompanied by large – scale alterations in the composition of the fecal microbiota // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 1203 – 1206.

21. Aminov R. I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature // *Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 11(12). – P. 2970–298.
22. Jain R., Rivera M.C., Moore J.E., Lake J.A. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution // *Mol Biol Evol.* – 2003. – Vol.20. – P.1598–1602.
23. Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U., Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2004. – Vol.2. – P. – 414–424.
24. Shafer W.M., Ohneck E.A. Taking the gonococcus – human relationship to a whole new level: implications for the coevolution of microbes and humans // *mBio.* – 2011. – 2(3):e00067 – 11. doi:10.1128/mBio.00067 – 11.
25. Venter J. C. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea // *Science.* – 2004. – Vol. 304. – P. 66–74.
26. Tringe S. G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities // *Science.* – 2005. – Vol. 308.0 – P. 554–557.
27. Norman A., Hansen L. H., Sørensen S. J. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool // *Trans R Soc. Lond B Biol. Sci.* – 2009. – Vol. 364(1527). – P. 2275–2289.
28. Shoemaker N. B., Vlamakis H., Hayes K., Salyers A. A. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – P. 561–568.
29. Datta N., Hughes V. M. Plasmids of the same Inc groups in enterobacteria before and after the medical use of antibiotics // *Nature.* – 1983. – Vol. 306. – P. 616–617.
30. Stokes H. W., Hall R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site – specific gene – integration functions: integrons // *Mol. Microbiol.* – 1989. – Vol. 3. – P. 1669–1683.
31. Gillings, M. R., Krishnan S., Worden P. J., Hardwick. S. A. Recovery of diverse genes for class 1 integron – integrases from environmental DNA samples // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2008. – Vol. 287. – P. 56–62.
32. Guerin E., Cambray G., Da Re S., Mazel D., Ploy M. C. The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons // *Med. Sci. (Paris).* – 2010. – Vol. 1. – P. 28–30.
33. Guerin E., Cambray G., Sanchez – Alberola N. et al. The SOS response controls integron recombination // *Science.* – 2009. – Vol. 324. – P. 1034.
34. Recchia G. D., Hall R. M. Gene cassettes: a new class of mobile element // *Microbiology.* – 1995. – Vol. 141. – P. 3015–3027.
35. Boucher Y., Labbate M., Koenig J. E., Stokes H. W. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria // *Trends Microbiol.* – 2007. – Vol. 15. – P. 301–309.
36. Rasko D. A. Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic–Uremic Syndrome in Germany // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 365. – P. 709–717.
37. Bush, K., Jacoby G. A. Updated functional classification of β -lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54. – P. 969–976.
38. Jones R. N., Phaller M. A. Bacterial resistance; a worldwide problem // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 31. – P. 379–88.
39. Fridkin S. K., Lawton R., Edwards J.R. et al. Monitoring antimicrobial use and resistance: comparison with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin – resistant Enterococci // *Emerg. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 8. – P. 702–707.
40. Rice L. B., Eckstein E. C., De Vente J. Cefazidime – resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center // *Clin. Infect. Dis.* – 1996. – Vol.23. – P. 118–124.
41. Seppala H., Klauka T., Vuopio – Varikila J. et al. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A Streptococci in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance // *N. Engl. J. Med.* – 1997. – Vol. 337. – P. 441–446.
42. Klare I., Badstubner D., Konstabel C. et al. Decreased incidence of VanA – type VRE isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry // *Microbial Drug Resistance.* – 1999. – Vol. 5. – P. 45–52.
43. Chiew Y.F. Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus Enterobacteriaceae // *J. Antimicrobial Chemother.* – 1998. – Vol. 41. – P. 247–51.
44. Nicolau D. P., Quintilliani R., Nightingale C. H. Antibiotic kinetics and dynamics for the clinician // *Med. Clin. North Am.* – 1995. – Vol. 79. – P. 477–495.
45. Nicolau D. P., Nightingale C. H., Banevicius M. A. Serum bactericidal activity of ceftazidime: continuous infusion versus intermittent injections // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1996. – Vol. 40. – P. 61–64.
46. ... // ... – 2004. – Vol. 11(70). – P. 102–110.

Поступила в редакцию 31 мая 2012 г.