

**В 2009 г. исполнилось 200 лет со дня рождения Чарльза Дарвина и 150 лет после публикации его труда «Происхождение видов путем естественного отбора, или Сохранение благоприятствуемых пород в борьбе за жизнь», провозгласившего важнейшие общие принципы в биологии. На этих принципах построено учение об эволюции, основной движущей силой которой является естественный отбор: «адаптируйся или умри». К данной концепции Дарвин пришел после 30 лет кропотливого исследования научных доказательств, которые он собрал во время кругосветного путешествия на борту корабля «Бигль» с 1831 по 1836 год.**

Дарвин занимался исследованиями во времена всеобщего убеждения, что мир был создан за 6 дней и произошло это примерно 6 тыс. лет назад. Это был период, когда о генетике и инфекционном происхождении заболеваний еще ничего не было известно, а появление новых форм жизни объяснялось исключительно спонтанным зарождением. Тем не менее — в соответствии с теорией эволюции — все очень быстро меняется. В 1886 г. Грегор Мендель опубликовал результаты своих опытов на гибридах гороха в экспериментальном монастырском саду, заложив фундаментальные принципы наследственности. Однако его труды многие годы не выходили за стены монастырской библиотеки в г. Брюнне, и Дарвина с ними так и не довелось познакомиться. Примерно в то же время Луи Пастер своими экспериментами с брожением доказал несостоятельность теории самозарождения. Его опыты, как известно, позволили установить роль микроорганизмов как возбудителей инфекционных заболеваний. Следующие 30 лет были периодом активной идентификации и изучения патогенных агентов человека, животных и растений. Вскоре стало ясно, что микроорганизмы можно найти абсолютно во всех экологических нишах. Идеальный образец выживания: адаптируйся или умри.

Можно только представить, какое влияние оказали бы эти исследования микроорганизмов, являвшиеся великолепным примером теории эволюции, на Дарвина, будучи проведенными в начале XIX века. Дарвин пришел к заключениям, анализируя окаменелые остатки организмов и изменения, которые он наблюдал в природном и искусственном отборе. Для этого ему пришлось подружиться с голубеводами и собаководами, использовавшими селекцию для создания новых видов. Тем не менее работа Дарвина была посвящена существованию, размножающимся половым путем, у которых ключевые генетические вариации осуществляются в ходе мейоза (рис. 1а) и смешивания генов между партнерами. Из-за длительных периодов гестации это относительно медленный процесс. В то же время бактерии

размножаются бесполо путем деления на две части (рис. 1б), причем время между делениями измеряется не днями, месяцами или годами, а минутами.

Микробы, эволюционировавшие свыше 3,5 млрд лет, являются, вероятно, наиболее легко приспосабливаемыми организмами на Земле, населяя практически все известные уголки планеты. Одни оккупируют полости разнообразных насекомых и беспозвоночных, другие колонизируют кожу, кровь, глаза и внутренние органы животных и человека. Микроорганизмы процветают в самых недружелюбных средах, таких как гидротермальные шахты на дне океана и полюса Земли. Как уже указывалось, они репродуцируются путем деления на две части и поэтому воспроизводят клоны друг друга. В этих обстоятельствах любая генетическая вариабельность требует случайных точечных мутаций в геноме, которые осуществляются предположительно с частотой  $1 \times 10^{-5}$ – $1 \times 10^{-8}$ . Эта частота является довольно низкой, однако следует помнить о том, что, например, в пищеварительном тракте микроорганизмы присутствуют в огромных количествах, и поэтому точечные мутации играют важную роль в генетической вариабельности. Тем не менее, если бы это был единственный механизм адаптации генетической структуры, бактерии, очевидно, никогда не смогли бы стать настолько успешными. Из-за неспособности к половому размножению бактериальные виды выработали ряд дополнительных механизмов, с помощью которых обмениваются генетическим материалом горизонтально, что дает им чрезвычайную генетическую гибкость. Горизонтальный перенос генетического материала между одинаковыми или разными видами может осуществляться по трем основным механизмам (табл. 1). Каждый из этих методов генетического обмена может приводить к образованию последовательностей ДНК, мало- или негомологических с ДНК клетки-реципиента. Унаследованная ДНК может остаться снаружи хромосомы (экстрахромосомно) или интегрироваться в нее.

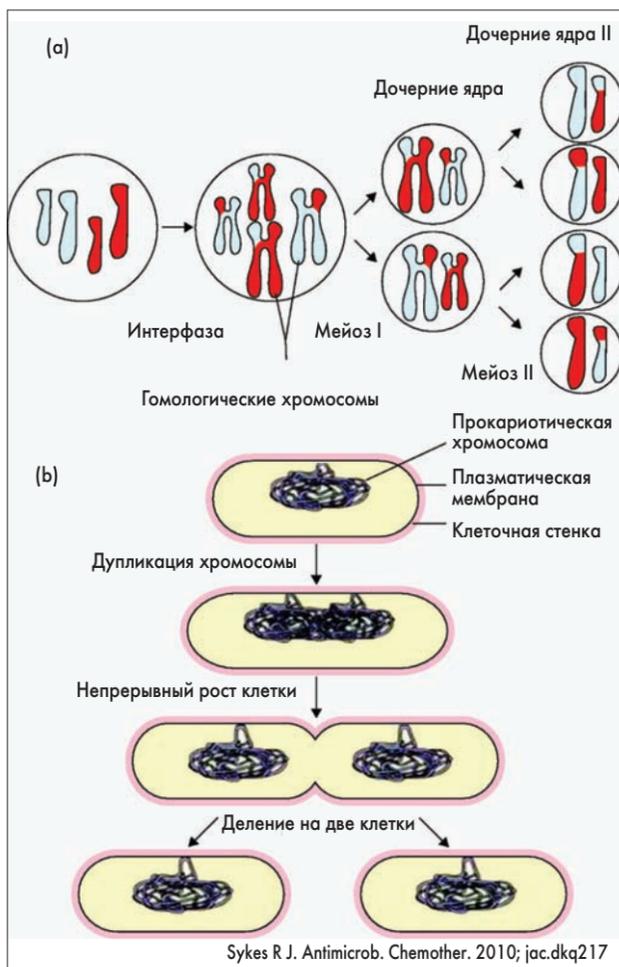


Рис. 1. Сравнительное изображение деления эукариотических клеток (мейоз; а) и бактерий (деление на две части; б)

Механизм	Способ захвата ДНК
Трансформация	Захват голой ДНК
Трансдукция	Перенос ДНК бактериофагом
Конъюгация	Перенос ДНК во время прямого клеточного контакта или путем перемещения плазмиды

С помощью всех трех механизмов могут образовываться гены антибиотикорезистентности, ассоциированные с рядом различных генетических объектов, из которых тремя основными являются:

- плазмиды — кольцевые двунитевые молекулы ДНК, отделенные от хромосомной ДНК и способные независимо от нее реплицироваться (перенос от одной клетки к другой осуществляется прямым механическим перемещением путем конъюгации или захватом путем трансдукции);

- транспозоны (прыгающие гены) — мобильные последовательности ДНК, способные передвигаться в различные положения в пределах генома одной клетки (транспозиция), при этом могут образовываться мутации; транспозоны в бактериях часто несут гены антибиотикорезистентности и могут перемещаться («прыгать») из хромосомной ДНК в плазмидную, и наоборот, что является удобным механизмом для развития мультирезистентных штаммов, а также возникновения мутаций;

- интегроны — генозахватывающие системы, обнаруживаемые в плазмидах, хромосомах и транспозонах, с помощью которых участки ДНК, так называемые кассеты генов, могут инкорпорироваться, экспрессироваться и диссеминировать. Интегрон содержит интегразу, обеспечивающую его вставку в геном; промотор, стимулирующий экспрессию; и ген, делающий возможным интеграцию в кассеты.

## Эволюция

# антибиотикорезистентности: дарвинистский взгляд

Считается, что горизонтальный перенос генов для многих видов бактерий является эссенциальным механизмом приобретения генетической пластичности. В процессе эволюции способность бактерий адаптироваться к новым условиям окружающей среды возникала, скорее всего, вследствие горизонтального переноса генов, а не в результате альтерации генных функций путем ряда точечных мутаций и вертикального переноса. Можно сказать, что бактерии первыми стали использовать генную терапию.

В настоящей статье сделана попытка проанализировать развитие антибиотикорезистентности за последние 70 лет и выяснить, как бактериям удается адаптироваться к широкому спектру враждебных окружений, которые мы им создаем. Чтобы проиллюстрировать, как бактерии приспосабливаются к «нападению» антибиотиков, я выбрал два микроорганизма — *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, из которых первый является высокоспециализированным патогеном человека, а второй — оппортунистическим нозокомиальным патогеном. Основное внимание будет уделено обсуждению взаимодействия данных бактерий с β-лактамами антибиотиками. Моим намерением является не «нагрузить» читателя научными терминами, а рассказать интересную историю, во многом связанную с моим собственным участием в данном процессе.

### *S. aureus*

#### Взаимодействие с β-лактамами антибиотиками

*S. aureus* — хорошо изученный патоген человека, обнаруживаемый на слизистых оболочках и коже примерно трети земной популяции. На момент синтеза пенициллина во второй половине 1930-х гг. *S. aureus* вместе со *Streptococcus pyogenes* были ведущей причиной заболеваемости и смертности, поэтому пенициллин, воздействующий на эти микроорганизмы, был воспринят как чудо-лекарство. Тем не менее эйфория продолжалась недолго, так как очень быстро стали появляться пенициллинрезистентные штаммы *S. aureus*. Уже в 1955 г. примерно 80% всех штаммов *S. aureus* были резистентными к пенициллину.

Здесь следует сделать небольшое отступление и рассмотреть механизм действия пенициллина, а также механизмы, связанные с развитием пенициллинрезистентности. В идеале, антибиотик достигает своих мишеней беспрепятственно и в неизменном виде, инактивирует их и в результате бактериальная клетка быстро теряет способность к выживанию и погибает. Однако бактерии имеют ряд природных и приобретенных механизмов, способных прерывать данный процесс на одном из его этапов.

В 1940-х гг. было установлено, что пенициллин действует на структуру и морфологию клеточной стенки, и до 1950-х гг. этот препарат был известен как специфический ингибитор синтеза клеточной стенки.

В 1960-х гг. были более детально описаны структура клеточной стенки бактерии и механизмы ее синтеза. У грамположительных бактерий, например у стафилококков, клеточная стенка представляет собой тесно сцепленную пептидогликановую структуру, которая обеспечивает ее форму и целостность (рис. 2). В ходе ранних исследований были идентифицированы две основные группы ферментов, расположенных на цитоплазматической мембране и принимавших участие в синтезе пептидогликанов, которые были чувствительны к действию пенициллина, — транспептидазы и карбоксипептидазы. На сегодня известно, что клеточная мембрана содержит целый ряд мишеней, так называемых пенициллинсвязывающих белков (ПСБ), и все они в той или иной степени вовлечены в синтез клеточной стенки. Пенициллин действует как стерический (пространственный) аналог D-аланин-D-аланин-пептида (миметика агрегации) и благодаря этому связывается с ферментами, участвующими в синтезе клеточной стенки. В результате эти ферменты инактивируются, что приводит к ослаблению структуры клеточной стенки

## Наша справка



Сэр Ричард Брук Сайкс (Richard Brook Sykes, родился 7 августа 1942 г.) – всемирно известный британский биохимик, бывший руководитель ряда фармацевтических компаний, среди которых крупнейшая – GlaxoSmithKline. Кроме того, он занимал должность ректора Имперского колледжа (г. Лондон, Великобритания) и до июня 2011 г. был старшим независимым директором Евразийской корпорации природных ресурсов (ENRC). В настоящее время Р. Сайкс является председателем Фонда стволовых клеток Великобритании и неисполнительным директором швейцарской биотехнологической компании Lonza AG.

Пребывание сэра Ричарда на должности ректора Имперского колледжа с января 2001 по июль 2008 года было не лишено ряда противоречий.

- В 2004 г. он возглавил неудачную попытку объединить Имперский колледж с Университетским колледжем г. Лондона.

- Ричард Брук Сайкс поддерживал повышение уровня максимальной платы за обучение в британских университетах с 3 до 10 тыс. фунтов стерлингов, что вызвало противодействие многих студенческих организаций. Это произошло задолго до реформ, проведенных коалиционным правительством Великобритании в 2011 г., разрешивших взимать плату за обучение 9 тыс. фунтов стерлингов.

- Его предшественник на должности ректора выступал посредником в слиянии Имперского колледжа с сельскохозяйственным колледжем Университета г. Лондона (Wye College). В конце 2004 г. Сайкс нарушил обещание сохранить дисциплину «Сельскохозяйственные науки», которая преподавалась в Wye College. В 2005 г. Имперский колледж объявил о своих планах организовать исследовательский центр, который будет заниматься созданием непивевых зерновых культур и топлива на основе биомассы, что интенсифицировало жилищное строительство на землях колледжа. Истинные масштабы этих планов (как выяснилось позже – превращение университетского поселения в город) скрывались от общественности самим Имперским колледжем, а также органами государственной власти графства Кент. Планы обрушились в июне 2006 г. после утечки информации и потери потенциального индустриального партнера, после чего Имперский колледж отказался от всех своих стремлений относительно развития кампуса и окружающих земель.

- В марте 2006 г. жалование сэра Ричарда стало в центре внимания персонала и студентов Имперского колледжа, после того как на первой полосе газеты студенческого союза FELIX была опубликована статья, в которой подчеркивалось, как много он зарабатывает. Годовое жалование сэра Ричарда составляло 305 тыс. фунтов стерлингов, что среди представителей университетского руководящего звена являлось вторым показателем после профессора Лауры Тайсон, декана Лондонской бизнес-школы.

Рыцарское звание Р. Сайкс получил в 1994 г. за заслуги перед фармацевтической индустрией. В настоящее время сэр Ричард обладает почетными учеными степенями 18 ведущих университетов разных стран мира.

и в итоге к ее разрыву, знаменующему гибель клетки. Пенициллин обладает очень высокой аффинностью к данным ферментам, благодаря чему является чрезвычайно эффективным в связывании со своими мишенями.

## Резистентность к β-лактамам антибиотикам

Важным фактором резистентности бактерий к антибиотикам является неспособность последнего достичь своей мишени, что может происходить вследствие низкой проницаемости клеточной стенки и/или инактивации антибиотика. В случае с β-лактамами антибиотиками, чтобы достичь своих мишеней, располагающихся на бактериальной цитоплазматической мембране, они должны пройти через оболочку клеточной стенки. У стафилококков и других грамположительных бактерий эта оболочка состоит из одного или более пептидогликановых слоев, связанных в анионный полимер (рис. 2). Клеточная стенка действует как молекулярное сито с размером ячейки 100 тыс. дальтон, однако она не является эффективным барьером для проникновения β-лактамов антибиотиков, имеющих размер около 300 дальтон, поэтому у стафилококков проницаемость не имеет практически никакого значения в резистентности к пенициллину.

Одним из ведущих механизмов резистентности к β-лактамам антибиотикам является ферментная инактивация. Еще до внедрения пенициллина в клиническую практику Абрахам и Чейн сообщили об идентификации энзима, способного инактивировать данную молекулу, и назвали его пенициллиназой. Последняя и другие родственные ферменты, получившие современное название β-лактамазы, гидролизуют циклическую амидную связь (β-лактамовое кольцо) чувствительных β-лактамов, в результате чего образуются неактивные соединения – молекулы с открытым кольцом, которые уже не распознаются строительными ферментами клеточной стенки.

В 1995 г. все случаи резистентности стафилококков к пенициллину являлись следствием ферментной инактивации β-лактамазами, каждая из которых представляет собой одиночный белок, кодируемый отдельным геном. Впоследствии было показано, что эти гены связаны с плазмидами, причем их перенос от

клетки к клетке происходит путем трансдукции (то есть с помощью бактериофага). Большинство стафилококков являются лизогенными (содержат фаги), и стафилококковые R-плазмиды передаются от клетки к клетке с помощью таких лизогенных фагов. β-Лактамаза, продуцируемая стафилококками, является индуцибельным внеклеточным ферментом, то есть ее продукция происходит только при необходимости – в присутствии β-лактамов антибиотиков.

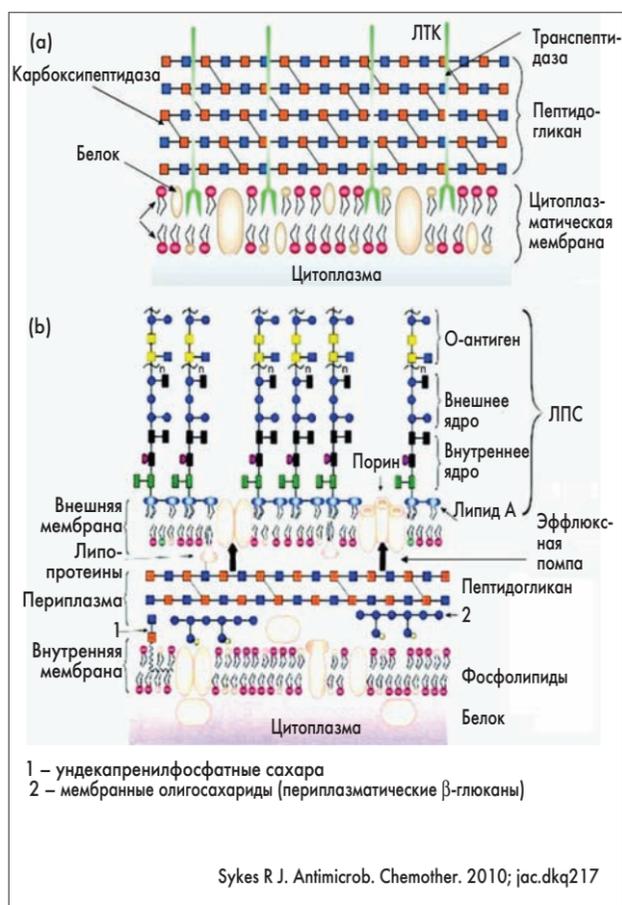


Рис. 2. Структура клеточных стенок *S. aureus* (а) и *P. aeruginosa* (б)

Число плазмидных копий может быть настолько высоким, что в сочетании с популяционным эффектом β-лактамаза может составлять до 1% сухого веса клетки. Такие огромные количества фермента, выходя за пределы клетки, инактивируют пенициллин еще до того, как он получит возможность достигнуть своей мишени, что обеспечивает высокий уровень резистентности. Следует отметить, что существует два противодействующих ферментных механизма, обладающих аффинностью к антибиотикам: транспептидаза (или другие ферменты, участвующие в синтезе клеточной стенки) и β-лактамаза. Чтобы быть эффективной, β-лактамаза должна иметь аффинность к β-лактамовому антибиотику на уровне, примерно соответствующему минимальной подавляющей концентрации (МПК) для данного микроорганизма. В случае со стафилококком МПК пенициллина составляет около  $10^{-7}$  моль – точно как и аффинность этого β-лактама к стафилококковой β-лактамазе. Таким образом, данный фермент является мощнейшим оружием против пенициллинов, особенно если он продуцируется в больших количествах.

Очевидно, что плазмиды, несущие гены для продукции β-лактамазы, появились не случайно. Плазмиды очень распространены среди бактерий, и горизонтальный перенос генов с помощью бактериофагов был несомненно очень частым явлением. Однако максимально полезность гена, продуцирующего β-лактамазу, бактерии смогли только с появлением пенициллина.

## Эволюция β-лактамазы

В какой период истории этот фермент мог появиться впервые? На сегодня доказано, что многие почвенные микробы (в том числе бактерии, стрептомицеты и грибы) способны продуцировать β-лактамовые антибиотики, и в то же время они выработали механизмы, защищающие их от воздействия своих же антибиотиков. Стафилококковая β-лактамаза в высокой степени гомологична β-лактамазе почвенного микроорганизма *Vacillus licheniformis*. В свою очередь, данный фермент близок по структуре к транспептидазе, участвующей в синтезе клеточной стенки. Это яркий пример эволюции, когда уже развитые механизмы после с виду незначительной адаптации используются для выживания в новой среде. В этом контексте интересно сравнить данный процесс адаптации с таковым метициллинрезистентных микроорганизмов, с которыми мы сталкиваемся сегодня. Анализ образцов почвы из Британского музея, собранных в XVII в., выявил содержание штаммов *Vacillus* spp., продуцирующих β-лактамазы. С появлением пенициллина эти микроорганизмы, несущие ген β-лактамазы, имели значительное преимущество и могли быстро передать его другим микроорганизмам путем горизонтального переноса с последующим быстрым образованием резистентных штаммов. Все это произошло за очень короткий период времени и является типичным случаем приспособительного выживания.

## Полусинтетические пенициллины

Ситуация с антибиотикорезистентностью требовала от фармацевтической индустрии разработки новых препаратов, устойчивых к действию β-лактамаз. Выделение пенициллинового ядра (6-аминопенициллановой кислоты, 6-АПК) в 1959 г. привело к созданию стабильных по отношению к β-лактамазам полусинтетических пенициллинов, таких как клоксациллин и метициллин. Эти соединения характеризовались высокой степенью резистентности к гидролизу стафилококковой β-лактамазой. Тем не менее вскоре после внедрения метициллина в клиническую практику в 1961 г. стали появляться метициллинрезистентные штаммы *S. aureus* (MRSA). За последние 50 лет эти микроорганизмы приобрели черты мультирезистентности и широко распространились по всему миру, став одними из важнейших возбудителей нозокомиальных инфекций. Во второй половине 1990-х гг. эти бактерии начали регистрировать в роли возбудителей внебольничных инфекций. Это великолепный пример того, как опасный патоген человека непрерывно эволюционировал, чтобы приспособиться к постоянно изменяющейся окружающей среде. Таким образом, глобальное распространение эпидемических клонов MRSA является результатом конвергенции нескольких необычных эволюционных процессов.

Продолжение следует .

