

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

© 2004 г. С. В. СИДОРЕНКО¹, В. И. ТИШКОВ^{1,2}

¹Государственный научный центр по антибиотикам, Москва,

²Химический факультет Московского государственного
университета им. М.В.Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Определения и терминология. III. Классификация биохимических механизмов антибактериальной резистентности. IV. Устойчивость к β-лактамам среди грамположительных и грамотрицательных бактерий, связанная с продукцией β-лактамаз. V. Устойчивость к гликопептидам среди *Enterococcus* spp. VI. Устойчивость к β-лактамам и гликопептидам среди *Staphylococcus aureus*. VII. Устойчивость к фторхинолонам среди грамположительных и грамотрицательных бактерий. VIII. Устойчивость к макролидам, кетолидам, линкозамидам и стрептограминам_в (группа МКЛС). IX. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Успехи антибактериальной терапии, программ вакцинации, а также возможность обеспечения населения качественной водой и продуктами питания создали в конце 60-х годов иллюзию близкой и окончательной победы над инфекционными заболеваниями. Так, выступая в 1969 г. в Конгрессе США, Вильям Стюарт (Surgeon General) заявил, что пришла пора «закрыть книгу инфекционных болезней».

Однако на рубеже XX–XXI столетий стало совершенно очевидным, что эта книга не только не закрыта, но еще далеко не прочитана. Возвращение «старых» и появление «новых» инфекционных болезней (гепатитов, ВИЧ, ТОРС, «птичьего» гриппа и др.) является серьезной угрозой благополучию и здоровью человечества.

Принятые сокращения: МПК — минимальная подавляющая концентрация; АБП — антибактериальные препараты; АМР — антимикробная (или антибактериальная) резистентность; ESBL (extended spectrum β-lactamases) — β-лактамазы «расширенного» спектра действия; ПСБ — «пенициллин-связывающие белки».

Данная работа поддержана грантами РФФИ № 02-04-49360 и Федерального министерства образования и науки ФРГ ВМВФ РТJ 31/0312702.

Адрес для корреспонденции: vit@enz.chem.msu.ru

Наряду с перечисленными инфекциями, крайне негативный эффект на здоровье человечества вызван появлением феномена устойчивости возбудителей к лечебным препаратам, приводящий к резкому снижению эффективности этиотропной терапии инфекционных болезней. Хотя неудачи лечения, связанные с резистентностью патогенных возбудителей, и не вызывают такого общественного резонанса, как появление новых инфекций, актуальность и серьезность этой проблемы в полной мере осознана международным медицинским сообществом.

В 2001 г. Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) был принят и опубликован фундаментальный документ «Глобальная стратегия по сдерживанию антимикробной резистентности» [94]. Предотвращение формирования и распространения антимикробной резистентности признано ВОЗ, странами Европейского Союза и Северной Америки в качестве глобальной проблемы, а также в качестве национального приоритета. В США распространение антимикробной резистентности рассматривается как одна из угроз национальной безопасности [21]. В перечисленных странах разработаны национальные программы по борьбе с распространением этого опасного феномена. В феврале 2004 г. на совещании экспертов ВОЗ в Верингероде (ФРГ), посвященном ходу реализации «Глобальной стратегии», было предложено рассматривать феномен антимикробной резистентности как новую инфекцию.

Во всех приведенных документах наряду с комплексом мероприятий, направленных на оптимизацию применения антибактериальных препаратов, большое внимание уделяется необходимости изучения генетических и биохимических механизмов антимикробной резистентности, а также закономерностей ее формирования и распространения.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ТЕРМИНОЛОГИЯ

С общебиологических позиций феномен устойчивости следует рассматривать как одно из проявлений способности микроорганизмов адаптироваться к неблагоприятным условиям внешней среды. Устойчивость к лечебным препаратам способны формировать все возбудители инфекционных болезней (бактерии, вирусы, простейшие). Наиболее общим термином для определения этого феномена является «антимикробная резистентность» (antimicrobial resistance — AMR) — АМР. Устойчивость бактериальных возбудителей инфекционных болезней к различным терапевтическим препаратам определяется как «антибактериальная резистентность», а их устойчивость к антибиотикам (β -лактамам, аминогликозидам, макролидам, тетра-

циклинам и др.) — веществам биологического происхождения или полусинтетическим производным, полученными на их основе, — как «антибиотикорезистентность».

Настоящая работа посвящена лишь рассмотрению проблемы устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам (АБП).

Здесь же уместно напомнить, что кроме антибиотиков для лечения инфекционных болезней используются также химиопрепараты — синтетические вещества, не имеющие аналогов в живой природе (сульфаниламиды, хинолоны, имидазолы и др.). Сам термин «химиотерапия» первоначально использовался только применительно к лечению бактериальных инфекций. Основным отличием АБП от других веществ, оказывающих токсическое действие на бактериальную клетку, следует признать их высокую избирательность. Как правило, АБП ингибируют метаболические процессы, уникальные для прокариотической клетки и отсутствующие у эукариотических клеток. Именно с этим связан тот факт, что в концентрациях, подавляющих жизнедеятельность бактерий, АБП обычно не оказывают существенного влияния на организм человека и животных.

Впервые идея о возможности создания веществ, избирательно подавляющих жизнедеятельность микроорганизмов (бактерий и простейших), была сформулирована Паулем Эрлихом в конце XIX — начале XX века и несколько позднее реализована им в препарате 418, обладавшем активностью в отношении трипаносом, и в препарате 606 (Сальварсан), применявшемся для лечения сифилиса.

ПРИРОДНАЯ И ПРИОБРЕТЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

С момента зарождения антибактериальной химиотерапии было очевидно, что лечебный эффект отдельных АБП проявляется далеко не при всех инфекционных болезнях. Систематическое экспериментальное изучение антибактериального действия различных препаратов позволило установить, что отдельные таксономические группы бактерий существенно различаются по уровню чувствительности, количественным выражением которого является величина минимальной подавляющей концентрации (МПК) АБП. Оказалось, что при значениях МПК, превосходящих максимально возможные для организма человека и животных, не проявляется клиническая эффективность АБП. Таким образом, на практике под природной устойчивостью понимают сохранение бактериями жизнеспособности в присутствии АБП в концентрациях, реально достижимых в организме человека. Природная резистентность является постоянным видовым признаком бактерий и легко прогнозируема.

Истинная природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени для проявления действия АБП. Так,

например, устойчивость микоплазм к β -лактамам связана с отсутствием у этих бактерий пептидогликана.

Под приобретенной устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при концентрациях АБП, подавляющих 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. Формирование резистентности во всех случаях обусловлено или приобретением новой генетической информации, или изменением уровня экспрессии собственных генов.

Появление и распространение приобретенной резистентности составляет основную клиническую проблему, поскольку ее наличие у конкретной бактерии – возбудителя инфекционной болезни, невозможно прогнозировать.

III. КЛАССИФИКАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ (АБР)

Все известные на сегодняшний день биохимические механизмы АБР можно подразделить на несколько групп:

1. *Модификация мишени действия АБП.* Структура мишеней действия АБП подвержена изменчивости в результате спонтанных мутаций в кодирующих их генах или иных генетических событий. Часть таких изменений может привести к снижению (или утрате) способности мишени связываться с АБП.

2. *Инактивация АБП.* Механизмы инактивации (ферментативного разрушения или модификации) существовали у бактерий, продуцирующих антибиотики, задолго до начала использования этих веществ в качестве медицинских препаратов. Скорее всего, они выполняли функции защиты бактерии-продуцента от собственного антибиотика. В последующем детерминанты резистентности распространились среди возбудителей инфекционных болезней у человека. В отличие от антибиотиков (веществ природного происхождения), химиотерапевтические препараты микробной клеткой, как правило, не инактивируются.

3. *Активное выведение АБП из микробной клетки (эффлюкс).* Известны, как минимум, четыре больших семейства транспортных систем, обеспечивающих активное выведение экзогенных веществ (в том числе и АБП) из бактериальной клетки. «Базовая» активность этих

систем во многом определяет уровень природной чувствительности бактерий к АБП. При активации выведения отмечают формирование приобретенной резистентности.

4. *Нарушение проницаемости оболочки микробной клетки.* Этот механизм распространен, в основном, среди грамотрицательных бактерий, обладающих внешней мембраной и является наименее специфичным в отношении АБП разных групп. Транспорт гидрофильных АБП внутрь микробной клетки осуществляется через пориновые каналы. Эффективность транспорта (как и эффективность эффлюкса) определяет уровень природной чувствительности бактерий к АБП. При нарушении структуры пориновых каналов или их утрате эффективность транспорта АБП резко снижается, что проявляется в формировании устойчивости к нескольким классам препаратов.

5. *Защита мишени.* Защита мишени относится к наименее изученным механизмам АБР. Установлено, что бактерии способны синтезировать белки, предотвращающие связывание АБП с мишенью, причем известно, что указанные белки связываются не с АБП, а с мишенью действия и каким-то образом модифицируют ее. Ранее этот механизм был известен только для тетрациклинов, однако сравнительно недавно он был описан и для хинолонов.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ АБР

Существует два принципиальных генетических механизма формирования АБР.

Приобретение новых для бактерии генов детерминант резистентности. Чаще всего новые для бактерий детерминанты резистентности приобретаются с подвижными генетическими элементами — плазмидами и транспозонами. Обычно с подвижными элементами передаются гены ферментов, инактивирующих антибиотики. Однако известны случаи, когда в состав подвижных элементов входят кластеры структурных и регуляторных генов, кодирующих метаболические пути синтеза модифицированных мишеней действия АБП. Считается, что на предшествующих этапах эволюции эти детерминанты были перенесены на подвижные генетические элементы с хромосом бактерий — первичных хозяев. Для ряда детерминант резистентности, локализованных на подвижных генетических элементах, первичные хозяева известны, однако для многих детерминант подобная информация отсутствует.

Модификация собственного генома. Наиболее типичным примером такого механизма являются мутации (аминокислотные замены, делеции, инсерции) в генах, кодирующих мишени действия АБП, системы эффлюкса, а также пориновые каналы. Резистентность к

химиопрепаратам формируется практически только по этому механизму. В формировании устойчивости к антибиотикам этот механизм имеет меньшее значение.

МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Общие принципы воздействия различных антимикробных препаратов представлены на рис. 1. В современной клинической практике можно выделить несколько механизмов резистентности, приводящих к крайне серьезным социально-экономическим последствиям. К таким механизмам относятся:

- устойчивость к β -лактамам среди грамположительных и грамотрицательных бактерий, связанная с продукцией β -лактамаз;
- устойчивость к гликопептидам среди *Enterococcus* spp.;
- устойчивость к β -лактамам и ванкомицину среди *Staphylococcus aureus*;
- устойчивость к фторхинолонам среди грамположительных и грамотрицательных бактерий;
- устойчивость к макролидам среди *Streptococcus* spp.

IV. УСТОЙЧИВОСТЬ К β -ЛАКТАМАМ СРЕДИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, СВЯЗАННАЯ С ПРОДУКЦИЕЙ β -ЛАКТАМАЗ

β -Лактамные антибиотики широко используются для лечения различных инфекционных заболеваний. В 2002 г. во всем мире было продано β -лактаменных антибиотиков более чем на 10 млрд долларов США, что составило около 50% от общей стоимости, полученной за все антимикробные препараты. Учитывая, что себестоимость их производства ниже, чем у многих других антибиотиков, то в весовом соотношении доля β -лактамов в общем потреблении АБП становится намного более 50%. Основным механизмом, обеспечивающим устойчивость практически всех клинически важных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий за рядом небольших исключений (см., например, ниже у *Staphylococcus aureus*), является наличие в этих штаммах одной или нескольких различных β -лактамаз. [17]

Поскольку пенициллин является продуктом жизнедеятельности плесневых грибов на протяжении десятков и сотен тысячелетий, то многие бактерии уже давно выработали механизм устойчивости к этому антибиотику. Например, разрушение пенициллина бесклеточными экстрактами клеток *E. coli* было впервые описано Е. Абрахамом и Е. Чейном [1] в 1940 г. еще до активного применения этого антибиотика на практике.

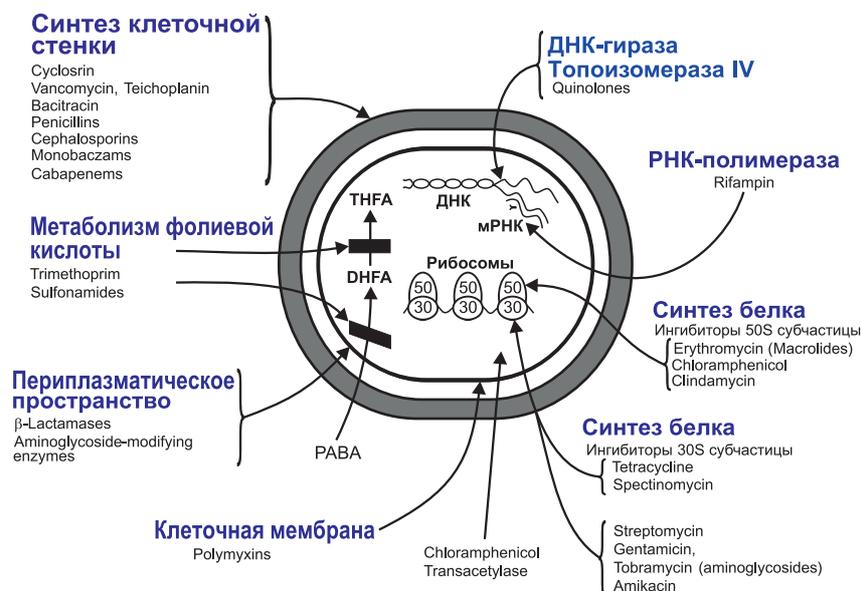


Рис. 1. Основные механизмы воздействия антибиотиков на клетку [53].

THFA, DHFA – тетрагидро- и дигидрофолиевая кислоты, соответственно; PABA – *p*-аминобензойная кислота

КЛАССИФИКАЦИЯ β -ЛАКТАМАЗ

В настоящее время известно более 400 различных β -лактамаз и в последние годы это количество стремительно нарастает – до нескольких десятков в год. Эти ферменты отличаются между собой как по происхождению (плазмидные или хромосомно кодируемые), так и по аминокислотной последовательности. Еще более β -лактамазы различаются по своим кинетическим свойствам (максимальная скорость и K_m с разными антибиотиками, чувствительности к ингибиторам). Неоднократно предпринимались попытки классификации этих ферментов [2, 32, 61, 76, 84]. В 60–70-х годах классификация была основана на субстратной специфичности – по характеру расщепления β -лактамов различных классов: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и др. [32] По мере развития биохимических и генетических методов исследования системы классификации стали учитывать такие свойства, как изоэлектрическая точка [84], взаимодействие с иммунными сыворотками против известных ферментов [80], локализацию фермента в геномном материале клетки-хозяина [76].

Современная классификация β -лактамаз подразделяет эти ферменты как по функциональным, так и по молекулярно-биологическим

ким признакам. Первый тип классификации особенно важен для практикующих врачей, поскольку именно тип функциональной активности определяет выбор антибиотика(ов) для эффективной терапии. В последнее время все большее значение приобретает молекулярная классификация, поскольку только использование данных о локализации и структуре генов β -лактамаз, а также информация о мутациях в этих ферментах позволит разработать быстрые и эффективные методики определения типа резистентности. Необходимость в таких методах стала особенно актуальной в последнее время, так как более 50% антибиотикорезистентных штаммов содержат по два – три типа различных β -лактамаз. В таких условиях очень сложно сделать вывод о характере того или иного типа фермента, основываясь только на данных по устойчивости к разным типам антибиотиков и ингибиторам. Даже эксперименты по конъюгации плазмид и изоэлектрофокусированию не позволяют точно идентифицировать тип фермента, а кроме того, эти методы требуют длительного (два-три дня) времени, в то время как диагностика типов β -лактамаз с помощью ДНК-чипов уже сейчас занимает от 2 до 6 часов.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ β -ЛАКТАМАЗ

Функциональная классификация β -лактамаз основана на их различной способности гидролизовать те или иные β -лактамные антибиотики. Для этого исследуемый клинический штамм культивируется при нескольких концентрациях определенного набора антибиотиков, в результате чего определяются соответствующие величины МПК. Широкое распространение получило также культивирование штаммов на твердых средах в чашках Петри. На поверхность агара на определенном расстоянии друг от друга помещают диски из фильтровальной бумаги с определенной концентрацией разных антибиотиков или антибиотика в комбинации с ингибитором (метод двойных дисков), что не только значительно облегчает проведение анализа, но и позволяет выяснить степень синергизма действия двух разных антибиотиков или антибиотика и ингибитора β -лактамаз.

В эпоху использования АБП на основе различных вариантов пенициллина (точнее, на основе его ядра – 6-аминопенициллановой кислоты) достаточно было 3–5 β -лактамов. По мере роста числа клинических штаммов, способных эффективно разрушать антибиотики пенициллинового ряда, для лечения инфекционных заболеваний стали применять новые классы и виды β -лактамных антибиотиков – цефалоспорины I–IV поколений, карбапенемы. Кроме того, эффективность этих антибиотиков существенно повышалась за счет комбинирования их с различными ингибиторами β -лактамаз. На рис. 2 представлены структуры ядер трех основных типов β -лактамных антибио-

тиков и трех наиболее широко используемых на практике ингибиторов β -лактамаз. Для достаточно точного определения функционального типа резистентности необходимо использовать до 10–15 антибиотиков всех трех классов и одного-трех ингибиторов, что существенно увеличивает трудоемкость и стоимость анализа.

В настоящее время функциональная классификация подразделяет все известные β -лактамазы на три функциональные группы (рис. 3). В первую группу входят ферменты, относящиеся к молекулярному классу С (β -лактамазы типа AmpC, см. ниже). Характерной особенностью этой группы является их более высокая активность к цефалоспориновым антибиотикам по сравнению с пенициллиновыми (поэтому их довольно часто называют цефалоспориноазами). Кроме того, эти ферменты малочувствительны к действию ингибиторов β -лактамаз. Штаммы, несущие резистентность первой группы, чувствительны к действию карбапенемов, хотя недавно были описаны β -лактамазы АСТ-1 [14] и СМУ-4 [18, 82], которые в комбинации с модификацией пориновых каналов повышали МПК к карбапенему от 16 до 64 раз. Еще 10–15 лет назад считалось, что это были только хромо-

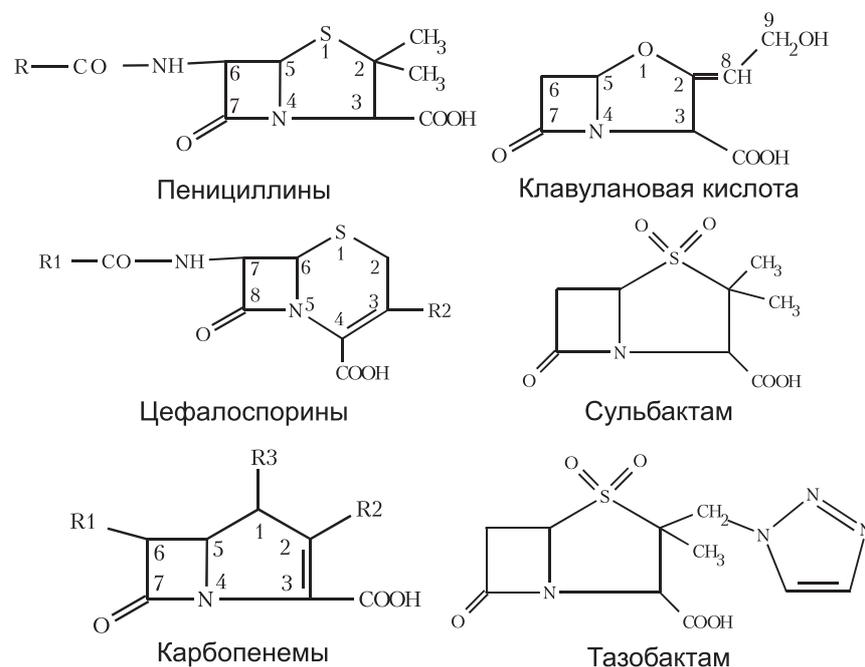


Рис. 2. Структура ядер трех основных типов антибиотиков и структуры наиболее часто используемых ингибиторов β -лактамаз.

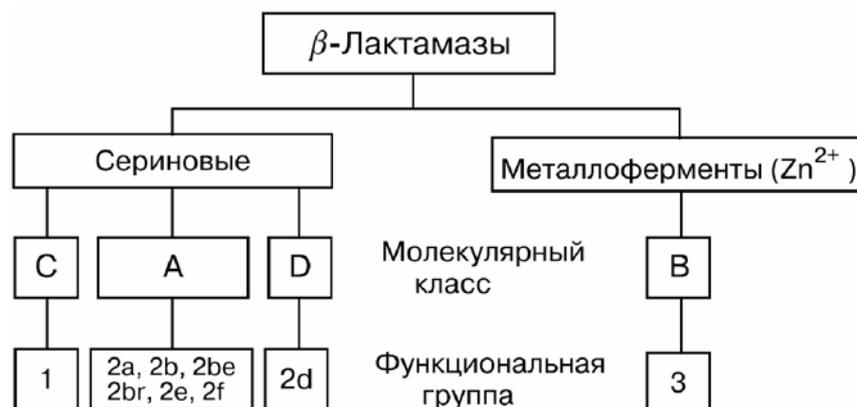


Рис. 3. Классификация β -лактамаз по молекулярным классам и функциональным группам.

сомно кодируемые ферменты. Однако в последнее годы появляется все большее количество публикаций о наличии генов этих ферментов в составе плазмид [69].

Во вторую функциональную группу, наиболее обширную и разнообразную, входят β -лактамазы молекулярных классов А и D. Гены ферментов второй группы входят в состав плазмид, поэтому эффективность их переноса между различными штаммами, а следовательно, и скорость распространения очень высоки.

К группе 2а относятся β -лактамазы грамположительных бактерий *Staphylococcus* spp. и *Bacillus* spp. Ферменты этой группы наиболее эффективны в отношении пенициллиновых антибиотиков (за исключением оксациллина и его аналогов).

Самыми известными представителями группы 2b являются β -лактамазы TEM-1, TEM-2 и SHV-1. Наиболее эффективно эти ферменты гидролизуют различные пенициллины (за исключением уреидопенициллинов) и значительно менее активны по отношению к цефалоспорином.

В подгруппу 2be входят многочисленные мутанты β -лактамаз типа TEM и SHV. Появление дополнительных мутаций привело к тому, что, наряду с пенициллинами, они стали эффективно расщеплять и цефалоспорины I-IV поколений. Широкая субстратная специфичность ферментов этой группы является причиной их другого широко используемого названия — β -лактамазы «расширенного» спектра действия («extended spectrum beta-lactamases» — ESBL). К этой же группе относятся многочисленные β -лактамазы типа CTX-M и TOHO. Характерной особенностью ферментов последнего типа является их

высокая гидролизующая активность к цефотаксиму и низкая активность с цефтазидимом.

Активность ферментов функциональных групп 2a, 2b и 2be эффективно подавляется ингибиторами β -лактамаз. Однако в ходе эволюции в ферментах типа TEM и SHV появились мутанты, не чувствительные к действию ингибиторов (они часто также обозначаются, как β -лактамазы типа IRT). Эти ферменты были выделены в отдельную группу 2bg. β -Лактамазы PSE грамотрицательных бактерий, относящиеся к группе 2c, часто называют карбенициллиназами за их высокую способность гидролизовать карбенициллин. Они, как и ферменты группы 2d, чувствительны к действию ингибиторов. β -Лактамазы OXA группы 2d входят в отдельный молекулярный класс D (см. ниже). Своё название оксациллиназы они получили за высокую активность с β -лактамами группы оксациллина.

Гены ферментов группы 2e локализованы на хромосомах. Они могут находиться как под контролем индуцибельных (*P. vulgaris*, *C. diversus*), так и конститутивных (*Bacteroides* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*) промоторов. β -Лактамазы, способные расщеплять карбапенемы — «последнюю линию обороны» в лечении β -лактамами антибиотиками, составляют группу 2f. Ферменты этой группы пока ещё достаточно редки, поскольку высокая стоимость карбапенемов (это самые дорогие β -лактамы) ограничивает их активное применение на практике.

В третью функциональную группу входят цинксодержащие β -лактамазы. Вначале они были обнаружены в геноме ряда патогенных штаммов: ген blm в *Bacillus cereus*, гены BlaB-1 — BlaB-8 в *Chryseobacterium meningosepticum*, ген bla2 в *Bacillus anthracis* [37]. Позднее они были найдены в составе плазмид (ген IMP-1 в *Serratia marcescens*, IMP-9 в *Shigella flexneri*, гены IMP-10 и -11 в *P. aeruginosa* [37]). Ферменты этой группы эффективно расщепляют все типы β -лактамов, включая карбапенемы, и малочувствительны к действию ингибиторов.

Разработка новых β -лактаменных антибиотиков и их внедрение в практику для лечения инфекционных заболеваний, вызванных штаммами, резистентными к известным антибиотикам, напоминает непрерывную борьбу брони и снаряда, поскольку через некоторый промежуток времени появляются штаммы, обладающие устойчивостью и к действию новых АБП. Отметим, что в последнее время промежуток между использованием нового препарата и появлением к нему устойчивости все более сокращается. Создание и применение большого количества β -лактамов привело к тому, что количество только известных β -лактамаз перевалило за 400. В такой ситуации функциональная классификация β -лактамаз становится малоэффективной даже при использовании большого набора (20 и более) различных

типов антибиотиков в сочетании с экспериментами по конъюгации плазмид и определению изоэлектрических точек. Эта проблема становится особенно актуальной при наличии в клиническом изоляте двух и более различных типов β -лактамаз. В свете изложенных данных молекулярная классификация β -лактамаз приобретает все большее значение.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ β -ЛАКТАМАЗ

Этот подход основан на анализе локализации генов β -лактамаз, сравнении их аминокислотных последовательностей и четвертичных структур этих ферментов. Дополнительную и очень важную информацию дает также анализ последовательностей ДНК, прилегающих к генам β -лактамаз. Реализация этого подхода стала возможной только в последнее время, благодаря внедрению в повседневную практику методов генетической инженерии (полимеразная цепная реакция, секвенирование ДНК по Сенгеру), а также данных по строению целых геномов большого количества патогенных микроорганизмов.

Происхождение β -лактамаз

В клетках прокариот существует большая группа белков и ферментов, называемая «пенициллин-связывающими белками» (ПСБ), которые участвуют в синтезе клеточной стенки. В эту группу входят ферменты самых различных классов, включая оксидоредуктазы и гидролазы. Основой бактерицидного действия β -лактамов является подавление роста клеточной стенки за счет ингибирования ПСБ (рис. 1). С рядом белков антибиотики связываются обратимо, но основной эффект обусловлен образованием необратимого комплекса ацил-фермент, сопровождающегося разрывом связи С–N в четырехчленном цикле, входящем в структурное ядро всех β -лактамов (см. рис. 2). В ходе эволюции за счет накопления точечных мутаций некоторые белки приобрели способность гидролизовать этот комплекс, что и привело к появлению β -лактамаз. Исходя из механизма реакции, β -лактамазы следует отнести к пептидазам. Сравнительный анализ всех последовательностей ПСБ и β -лактамаз подтвердил гипотезу о наличии общего предшественника у этих белков (рис. 4, см. стр. 276) [59].

Данные эволюционного анализа хорошо согласуются с анализом четвертичных структур. На рис. 5 (см. стр. 276) приведены структуры β -лактамаз молекулярных классов А (рис. 5А и В), В (рис. 5С), С (рис. 5D) и одного из представителей ПСБ – DD пептидазы-транспептидазы из *Streptomyces* sp. R61 (рис. 5E). Из этого рисунка хорошо видно, что β -лактамазы имеют общий консервативный мотив в строении β -листа, ответственного за формирование активного центра. Причем этот структурный мотив одинаков как для сериновых (структуры А, В и D), так и металл-содержащих ферментов (структура С).

СЕРИНОВЫЕ- β -ЛАКТАМАЗЫ

По механизму действия все β -лактамазы можно разделить на две основные группы. В первую группу входят сериновые протеазы – ферменты, у которых нуклеофильная атака пептидной связи в β -лактамом кольце осуществляется остатком серина. В активном центре ферментов второй группы находятся ионы металлов (как правило, ионы цинка). Дальнейшая классификация сериновых β -лактамаз основана на их различии в других аминокислотных остатках, существенных для катализа. Так β -лактамазы молекулярного класса А в дополнение к существенному остатку Ser (Ser68 и Ser66 в β -лактамазах TEM-1 и SHV-1, соответственно) для активации молекулы воды имеют в активном центре консервативный остаток Glu (так называемый Glu-166). В случае β -лактамаз молекулярного класса С для активации молекулы вместо остатка Glu используется остаток Tyr.

Подробный анализ взаимосвязи между сериновыми β -лактамазами был сделан в работе [38]. В дополнение к анализу аминокислотных последовательностей было проведено сравнение 18 уникальных структур для этих ферментов. Оба подхода свидетельствуют, что дивергенция между β -лактамазами молекулярных классов А и С произошла намного раньше, чем между ферментами молекулярных классов А и D.

Отметим, что структурный подход в сравнительном анализе β -лактамаз из разных источников приобретает все большее значение. Количество структур этих ферментов в комплексе с различными соединениями увеличивается из года в год в экспоненциальной зависимости. Более того, растет также и количество уникальных структур. Данные рентгеноструктурного анализа все более широко используются при создании новых β -лактамных антибиотиков [78].

СЕРИНОВЫЕ- β -ЛАКТАМАЗЫ КЛАССА А

Многие авторы отмечают исключительно большое разнообразие в аминокислотной последовательности β -лактамаз из разных источников. Особенно это справедливо для ферментов молекулярного класса А. В рамках данного обзора просто невозможно привести все имеющиеся в литературе данные. Мы остановимся только на трех типах ферментов – TEM, SHV и CTX-M, поскольку среди β -лактамаз класса А именно они и ответственны за наличие широкого спектра устойчивости к β -лактамным антибиотикам. Гены всех трех типов ферментов находятся в плазмидах, что и обуславливает их быстрое распространение.

 β -Лактамазы группы TEM

Первый фермент этой группы – TEM-1, был найден в начале 60-х годов прошлого столетия в клетках *E. coli*, выделенных из крови инфицированных пациентов [28]. Свое название он получил от фамилии

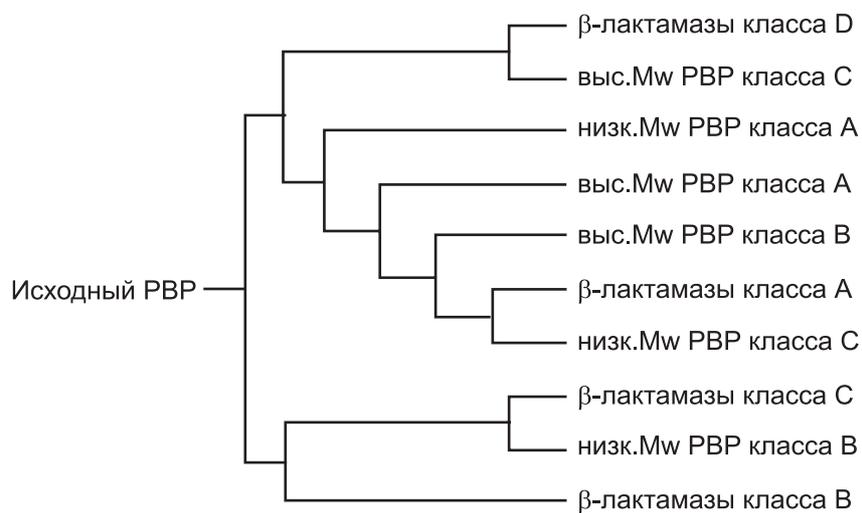


Рис. 4. Эволюция β-лактамаз и пенициллинсвязывающих белков от общего белка-предшественника [59].

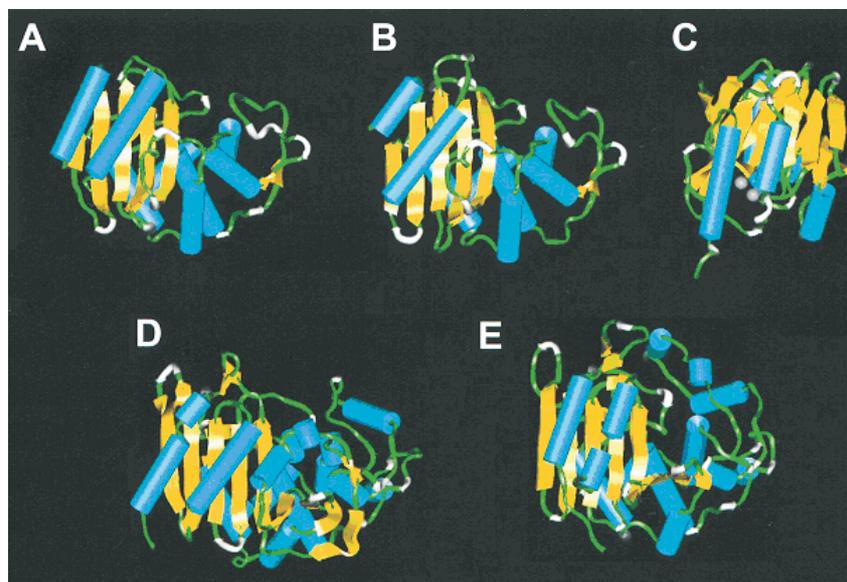


Рис. 5. Сравнение структур β-лактамазы класса А TEM-1 из *E. coli* (А), β-лактамазы класса А из *B. licheniformis* 749/С (В), β-лактамазы класса В из *B. fragilis* (С), β-лактамазы класса С из *E. cloacae* P99 (D) и DD-пептидазы-транспептидазы из *Streptomyces* sp. R61 (E) (модифицированный рисунок из работы [59]).

Temoniera – первого пациента, у которого был обнаружен [60]. Отметим, что в то время наименования β -лактамаз (по имени пациентов, первооткрывателей и т.д.) давались без учета их аминокислотной последовательности. Это привело к тому, что один и тот же фермент может иметь несколько наименований. Буквально в течение нескольких лет плазмиды с TEM-1 были найдены в штаммах *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* и *Neisseria gonorrhoeae*. Позднее был описан еще один фермент TEM-2, отличающийся от TEM-1 единственной мутацией Gln39Lys, которая приводила к изменению изоэлектрической точки, но не кинетических свойств [31].

TEM-1 и TEM-2 являются пенициллиназами. Однако широкое внедрение в клиническую практику с начала 80-х годов оксиминовых производных цефалоспоринов привело к появлению новых мутантных форм этого фермента с широкой субстратной специфичностью по отношению к цефалоспориновым (β -лактамазы «расширенного» спектра действия; см. выше раздел «Функциональная классификация»). Активное внедрение в клиническую практику методов генетической инженерии и рост количества резистентных к действию антибиотиков штаммов приводит к тому, что темпы открытия новых мутантных ферментов все время возрастают. Если к середине 2001 г. было известно чуть более 90 разновидностей TEM, то к концу 2003 г. в базе данных насчитывалось уже 127 β -лактамаз этого типа. (Хотя последний мутант имеет номер 133, 6 ферментов были исключены из базы после сравнения их аминокислотных последовательностей. Кроме того, полные данные по аминокислотным последовательностям доступны только для 111 белков). Таким образом, менее чем за 2,5 года было обнаружено более 35 новых β -лактамаз. Мы не будем останавливаться на каждом мутанте (подробное описание всех аминокислотных замен можно найти в Интернете по адресу <http://www.lahey.org/studies/>) и рассмотрим лишь места локализации мутаций и их влияние на свойства фермента.

Локализация мутаций в аминокислотной последовательности. β -Лактамаза TEM-1 имеет молекулярную массу около 29 кДа и состоит из 288 аминокислотных остатков (в некоторых статьях значения положений смещены на единицу из-за учета первого остатка метионина в рекомбинантном ферменте). В настоящее время мутации найдены в 39 положениях, однако частота мутаций в каждом положении сильно варьирует. На рис. 6 представлены наиболее часто встречаемые замены в молекуле TEM-1, приводящие к появлению ферментов с «расширенным» спектром действия [15]. Как видно из рисунка, основные замены происходят в основном в восьми положениях – в 21, 39, 104, 164, 182, 238, 240 и 265. Если учесть, что замена Gln39Lys не влияет на профиль субстратной специфичности, то

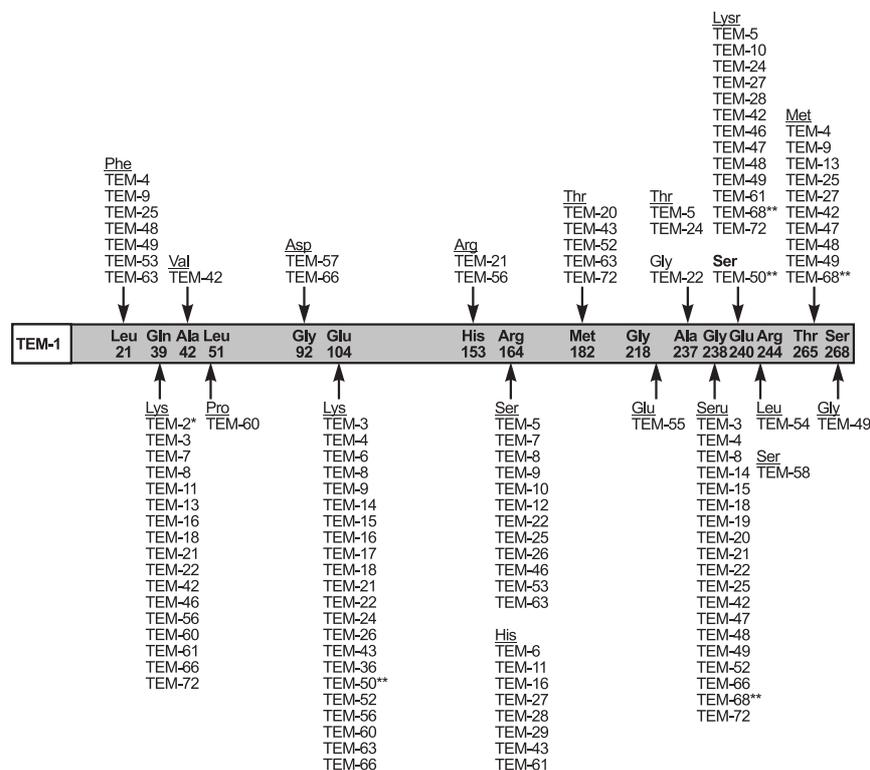


Рис. 6. Положения и типы аминокислотных замен в β -лактамазе TEM-1, приводящих к образованию ферментов с «расширенным» спектром действия [15].

Двойной звездочкой отмечена β -лактамаза TEM-50, обладающая также фенотипом устойчивости IRT.

количество положений уменьшается всего до 7. Из 111 β -лактамаз типа TEM-1 и TEM-2 с известными последовательностями только 84 относятся к группе ESBL. Частота замен в этих 84 ферментах в положениях 21, 104, 164, 182, 238, 240 и 265 составляет 20, 30, 31, 16, 28, 19 и 20 раз, соответственно. Из этих данных также следует, что в каждом мутанте можно наблюдать от 2 до 5 аминокислотных замен, не считая мутации Gln39Lys.

Влияние мутаций на свойства и субстратную специфичность. Одним из методов, используемых для дифференциации β -лактамаз, является определение их изоэлектрической точки. Введение в TEM-1 таких замен, как Glu104Lys, Arg164Ser, Glu240Lys и др. (см. рис. 6) приводит к изменению общего заряда белковой глобулы и, как следствие, к изменению значения pI. Величина изоэлектрической точки для

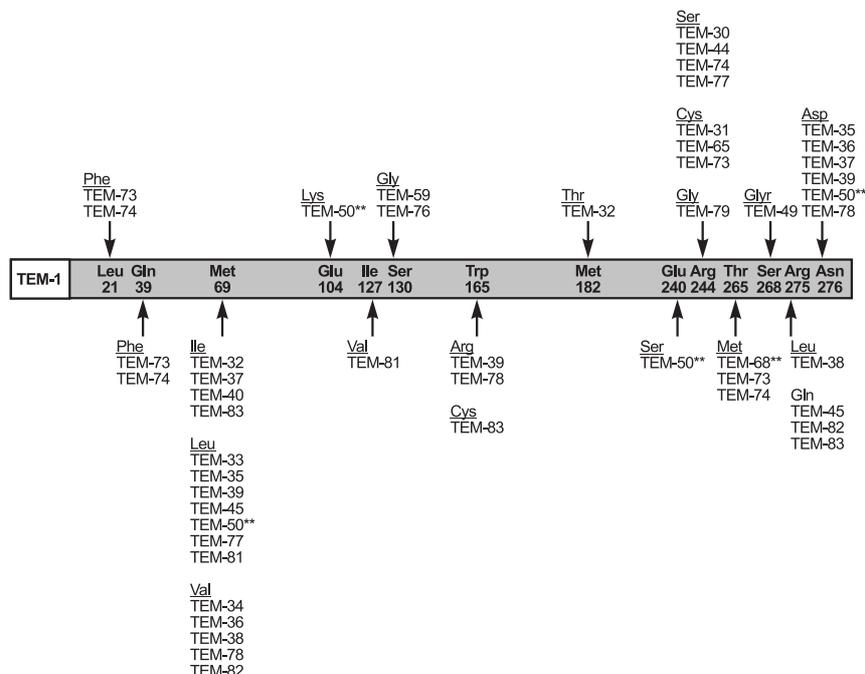


Рис. 7. Мутации в β -лактамазах типа TEM, обуславливающие устойчивость к ингибиторам [15].

Указаны только те мутации, которые являются общими для всех ферментов с фенотипом IRT. Двойной звездочкой отмечена β -лактамаза TEM-50, также обладающая фенотипом устойчивости ESBL.

β -лактамаз группы TEM варьирует в диапазоне 5,2–6,4. Вполне очевидно, что из-за большого количества мутантных форм этого фермента практически невозможно определить тип его мутанта на основании этого параметра.

Одним из важнейших последствий мутаций является изменение субстратной специфичности. Как уже упоминалось выше, в результате таких мутаций возникают ферменты типа ESBL, однако их активность с разными β -лактамами зависит от типа мутации. Мутация Gly238Ser приводит к появлению ферментов, способных одинаково хорошо разрушать цефотаксим и цефтазидим [15], в то время как ферменты, содержащие мутацию Arg164Ser, более активны с цефтазидимом и менее – с цефотаксимом.

Второй тип мутаций приводит к появлению ферментов, не чувствительных к действию ингибиторов (фенотип устойчивости IRT, подгруппа 2br) (рис. 7). Как видно из рисунка, наиболее часто встреча-

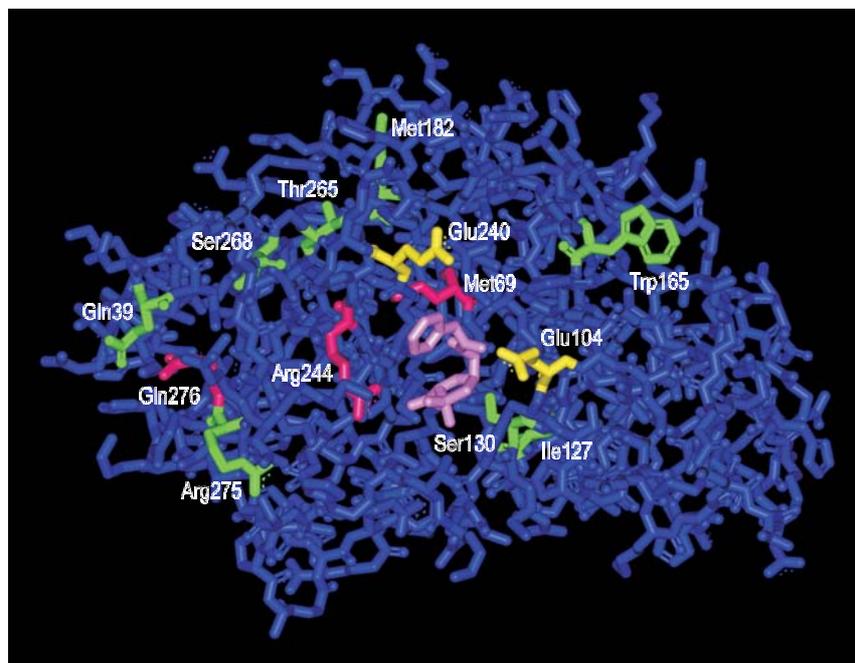


Рис. 8. Структура β -лактамазы TEM-1, ацилированная открытой формой пенициллина G (показана розовым цветом).

Красным цветом выделены остатки Met69, Arg244 и Gln276, замены которых наиболее часто наблюдаются при появлении β -лактамаз, устойчивых к действию ингибиторов. Желтым цветом указаны остатки Glu104 и 240, мутации которых приводят к получению TEM-50, обладающей двойным фенотипом устойчивости. Зеленым цветом выделены остатки, также приводящие к устойчивости против действия ингибиторов β -лактамаз.

ются замены в положениях 69, 244 и 276 (по данным некоторых авторов [83], в этом положении находится остаток Gln вместо Asn). В настоящее время известно 28 изоферментов TEM с фенотипом устойчивости IRT.

Комбинация мутаций первого и второго типа позволяет получить варианты TEM, обладающие обоими типами устойчивости – ESBL + IRT. На рис. 6 и 7 один из таких мутантов – TEM-50 – отмечен двойной звездочкой.

Пространственное расположение мутаций. Одним из наиболее удивительных и важных моментов является то, что мутации в молекуле TEM, приводящие к возникновению нового фенотипа устойчивости, располагаются как вблизи, так и вдали от активного центра. На рис. 8. показана белковая глобула, ацилированная открытой фор-

мой пенициллина G β -лактамазы TEM -1 с указанием а.о., мутации которых приводят к появлению IRT (в качестве основы взята структура PDB1FQG [83]). Отметим, что из трех наиболее часто встречаемых замен а.о. (выделены красным цветом) в активном центре расположен только Met69, по соседству с которым располагается каталитически важный остаток Ser68. Расстояние между вторым, наиболее часто подвергающимся заменам Arg244 и Ser68, составляет в среднем более 7 Å, а третий остаток из этой группы, Gln276(Asn266, по данным работы [15]), расположен на поверхности белковой глобулы – вдали от активного центра.

Желтым цветом выделены остатки Glu104 и Glu240. Они находятся в активном центре. Мутации этих остатков вместе с мутацией Gln276Asp приводят к образованию TEM-50, обладающей двойным фенотипом устойчивости. Среди других положений в аминокислотной последовательности TEM, мутации в которых приводят к появлению устойчивости типа IRT, только остатки Ile127 и Ser130 находятся в активном центре, а остальные расположены вдали от активного центра. Аналогичная картина наблюдается и при анализе положения мутаций, приводящих к появлению ESBL.

Таким образом, можно сделать вывод, что изменение субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам для β -лактамаз группы TEM может происходить как за счет изменения «ближних», так и «дальних» взаимодействий между аминокислотными остатками. Это же положение соблюдается и для других типов β -лактамаз. Понятно, что такие сложные взаимодействия сильно затрудняют компьютерное предсказание новых β -лактаманых антибиотиков.

β -Лактамазы группы SHV

Ферменты этой группы являются вторыми по клинической значимости возникновения резистентности к β -лактамам. β -Лактамаза SHV-1 кодируется в хромосоме большого количества клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* [58], однако основная устойчивость (до 20% всех штаммов) связана с плазмидно кодируемым ферментом [87]. В штаммах *E. coli* ген этого фермента встречается только в составе плазмид. Все мутантные формы SHV кодируются как в хромосоме, так и на плаزمиде. К середине 2003 г. в базе данных <http://www.lahey.org/studies/> имелась информация о 53 мутантах. Для 45 из них известны полные аминокислотные последовательности. В отличие от ферментов группы TEM мутантные SHV появились как в результате точечных замен, так и в результате делеций (SHV-9 и SHV-10) [73,74] или вставок (SHV-16) [4]. Изоэлектрические точки этих ферментов находятся в диапазоне pI 7,0–8,2.

В случае мутантных SHV, обладающих фенотипом устойчивости ESBL, аминокислотные замены были обнаружены в 40 положениях плюс делеция в положении 54 (SHV-9) и вставка 163DRWET167 в SHV-16. Наиболее часто мутации наблюдаются в положениях 36 (замена Leu на Gln), 238 (Gly на Ser или Ala) и 240 (Glu на Lys). В зависимости от типа замены, как и в случае ферментов TEM, получаются мутантные SHV с различной специфичностью по отношению к цефтазидиму и цефотаксиму [45, 58]. Единственная известная β -лактамаза SHV-10 с фенотипом устойчивости IRT, но не ESBL, отличается от мутанта SHV-9 (устойчивость типа ESBL) всего одной аминокислотной заменой – Ser130Gly [71, 74].

В феврале 2003 г. появилось сообщение о выделении у пациента из отделения интенсивной терапии Европейского госпиталя им. Ж.Помпиду (Париж, Франция) клинического изолята *K. pneumoniae* Log-1, способного, кроме цефалоспоринов (устойчивость ESBL, функциональная подгруппа 2be), также расщеплять и имепенем (функциональная подгруппа 2f) [72]. Кроме того, этот штамм был устойчив к действию амоксициллина или тикарциллина в присутствии клавулановой кислоты и пиперациллина + тазобактам (МПК >512, функциональная подгруппа 2br). Ферментом, ответственным за такой широкий спектр, оказалась хромосомно кодируемая β -лактамаза SHV-38. Единственное отличие этого фермента от SHV-1 состояло в аминокислотной замене Ala146Val. Полученные данные еще раз свидетельствуют о трудностях однозначного отнесения β -лактамаз к определенной функциональной группе.

β -Лактамазы группы CTX-M

Ферменты типа CTX-M получили свое название вследствие того, что они отличаются высокой скоростью гидролиза цефотаксима и низкой активностью по отношению к цефтазидиму. К этой же группе относятся β -лактамазы Toho-1 и 2, а также UOE-1. Эти ферменты были выделены в отдельную группу намного позже, чем β -лактамазы групп TEM и SHV. Гены ферментов этой группы имеют плазмидную локализацию. Вначале ферменты группы CTX-M в основном были обнаружены в клинических штаммах, выделенных в Восточной Европе, Японии и Южной Америке. В настоящее время география распространения и разнообразие видов этих ферментов непрерывно расширяются. Если в начале 2002 г. было известно только 22 фермента этой группы, то к началу 2004 г. их было уже 33.

Между β -лактамазами группы CTX-M и групп TEM и SHV гомология слабо выражена (менее 40%) [88]. Внутри самой группы степень гомологии также невелика. На рис. 9 представлены данные по эво-

ленное ферментами этой группы, связано в первую очередь не с точечными мутациями, а с их быстрым распространением в составе плазмид.

СЕРИНОВЫЕ β -ЛАКТАМАЗЫ КЛАССА С

β -Лактамазы этого класса в основном кодируются в хромосоме штамма-хозяина. Гены этих ферментов *ampC* были найдены в хромосомах самых различных групп бактерий: *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Chromobacterium violaceum*, *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Lysobacter lactamgenus*, *Morganella morganii*, *Ochrobactrum anthropi*, *Proteus rettgeri*, *Providencia stuartii*, *P. aeruginosa*, *Psychrobacter immobilis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *S. marcescens* и *Yersinia enterocolitica*. Клиническая значимость этих ферментов для проявления антибиотикорезистентности сильно зависит от штамма.

В ряде микроорганизмов (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.) экспрессия гена *ampC* является индуцибельной — ее уровень регулируется генами *ampD*, *ampG*, *ampR* и промежуточными продуктами синтеза пептидогликанов [48, 92]. Индукция эффективно происходит под действием ампициллина и цефалоспоринов I поколения (но не II–IV). В других штаммах, например в *E. coli*, экспрессия гена *ampC* является очень низкой. Она очень слабо регулируется по механизму обратной связи с торможением скорости клеточного роста [50] и не является индуцибельной из-за отсутствия гена *ampR* [48]. Резистентность в этом случае появляется в результате неконтролируемой гиперэкспрессии *ampC*, вызванной мутацией в гене *ampD*. Этот же механизм реализуется при устойчивости к цефалоспорином II–IV поколений. В других штаммах (*Klebsiella* spp., *Salmonella enterica* серотипы *Typhimurium* или *Paratyphi*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *P. mirabilis* и др.) ген *ampC* вообще отсутствует.

Как уже отмечалось выше, β -лактамазы AmpC наиболее активны в расщеплении цефалоспоринов и малочувствительны к действию ингибиторов. Поэтому появление и распространение антибиотикоустойчивости за счет этих ферментов стало особенно заметным после внедрения в практику различных цефалоспоринов и ингибиторов β -лактамаз. Именно в это время стали появляться сообщения об обнаружении штаммов с фенотипом устойчивости AmpC, которая могла передаваться от одного штамма к другому [52, 55]. Достоверное описание и молекулярно-биологические доказательства передачи β -лактамаз AmpC между штаммами различных родов с помощью плазмид впервые появились в конце 80-х — начале 90-х годов прошлого столетия [8, 66]. В настоящее время уже известно более двух десятков плазмидно кодируемых β -лактамаз AmpC. Плазмиды с

этими ферментами были выделены из клинических штаммов практически по всему миру – в Европе (BIL-1, CMY-2, CMY-3, ACC-1, LAT-3, LAT-4), Северной (MIR-1, ACT-1) и Южной (FOX-1) Америке, Северной Африке (CMY-4), на Ближнем Востоке (DHA-1), в Японии (MOX-1) и других странах этого региона (CMY-1, CMY-8). Подробное описание этих ферментов и профили субстратной специфичности к разным β -лактамам можно найти в работе [69].

Ферменты группы AmpC имеют более длинную полипептидную цепь, чем β -лактамазы класса A. В зависимости от источника выделения ферменты имели 378 [7], 381 [10, 34, 49], 382 [12, 44] и 386 [9] аминокислотных остатков. Значения pI этих β -лактамаз находятся в широком диапазоне – от 6,2 (FOX-4) до 9,2 (MOX-2 и CMY-4) [69].

Интересной особенностью биосинтеза большого числа этих плазмидно-кодируемых ферментов является неиндуцибельная гиперэкспрессия даже в отсутствие антибиотиков. Размер плазмид варьирует от 7 до 180 тыс. пар оснований [44, 82]. Как правило, в состав больших плазмид входят также гены других β -лактамаз и гены, обеспечивающие устойчивость к другим антимикробным препаратам – аминогликозидам, хлорамфениколу, сульфонамиду, тетрациклину и др. [82].

Быстрое распространение генов AmpC происходит благодаря тому, что они входят в состав интронов, обеспечивающих эффективный обмен генетическим материалом. По оценкам различных исследователей доля клинических штаммов, содержащих плазмидно-кодируемые ферменты AmpC, в 90-х годах прошлого столетия составляла от 0,4% (*P. mirabilis*) до 1,6% (*E. coli*) от общего числа изолятов, устойчивых к β -лактамам [69]. В настоящее время доля таких штаммов продолжает расти.

СЕРИНОВЫЕ- β -ЛАКТАМАЗЫ КЛАССА D

Ферменты этого класса (OXA) вначале были выделены в отдельную группу скорее по фенотипическим (высокая активность по отношению к оксациллиновым β -лактамам), чем по генетическим причинам (некоторые ферменты внутри семейства имеют довольно низкий уровень гомологии – 40%). Однако по мере накопления данных по аминокислотным последовательностям и структурам β -лактамаз ферменты группы OXA были выделены в отдельный молекулярный класс D. На данный момент в базе данных <http://www.lahey.org/studies/> имеется информация о 51 ферменте этой группы (37 известных последовательностей) и более половины из них были найдены в течение последних 5 лет. Изоэлектрические точки этих ферментов варьируют от 5,5 (OXA-18) до ≥ 9 (OXA-29).

Не все ферменты молекулярного класса D имеют фенотип устойчивости ESBL. Из 35 охарактеризованных ферментов только 16 относятся к функциональной группе 2be. В табл. 1 представлены данные по аминокислотным заменам в ферментах группы OXA, принадлежащих к этой функциональной группе. В качестве основного в этой группе рассматривают OXA-10 (альтернативное название Pse-2). Наиболее важной мутацией считается замена Gly167Asp. Полагают, что именно она приводит к высокой эффективности расщепления цефтазидима [27].

В отличие от β -лактамаз TEM и SHV с фенотипом ESBL, найденных в основном в *E. coli*, *K. pneumoniae* и других *Enterobacteriaceae*, все ферменты OXA с этим фенотипом были впервые обнаружены у *Pseudomonas aeruginosa* [15]. Описан только один случай выделения фермента этой группы – OXA-21, из другого штамма – *Acinetobacter baumannii* [90]. В ряде работ отмечается «оптимизация» β -лактамаз типа OXA на проявление высокой активности именно в *P. aeruginosa*. Например, OXA-11 была малоэффективна против оксиминоцефалоспоринов в клетках *E. coli*, в то время как в *P. aeruginosa* она обеспечивала высокий уровень устойчивости [36]. Из приведенных данных можно сделать вывод, что этот тип устойчивости играет гораздо меньшую роль в общей картине резистентности к β -лактамам по сравнению с ферментами других типов.

МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗЫ (МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КЛАСС B)

В отличие от сериновых β -лактамаз ферменты этого типа содержат в активном центре два атома цинка. Впервые гены ферментов этого типа были обнаружены в хромосомах *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus anthracis*, *Aeromonas hydrophila*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia* и др. В настоящее время описаны плазмидно-кодируемые металло-лактамазы IMP-1 и IMP-6 (*Serratia marcescens*), IMP-8 (*Klebsiella pneumoniae*), IMP-9 (*Shigella flexneri*), IMP-10 и IMP-11 (*P. aeruginosa*), VIM-1 (*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*).

Сравнение аминокислотных последовательностей ферментов, относящихся к этому классу, свидетельствует о наличии трех подгрупп – B1, B2 и B3 [37]. Подгруппы B1 и B2 эволюционно связаны между собой, в то время как β -лактамазы, входящие в B3, представляют собой отдельную группу.

К началу 2004 г. в банке трехмерных структур PDB было около 20 разных структур для трех металло- β -лактамаз *blm* из *B. cereus*, *ScrA* из *Bacteroides fragilis* и IMP из *P. aeruginosa*. Гомология между этими ферментами не превышает 30–40%, однако трехмерные структуры очень

Таблица 1
Аминокислотные замены в β -лактамазах ОХА с фенотипом устойчивости ESBL

β -Лак-тамаза	Положение в аминокислотной последовательности																			Ссылка	
	10	20	48	58	67	76	110	127	131	144	149	164	167	169	184	208	240	258	272		pI
OXA-10	I	G	K	D	L	N	T	A	G	Y	I	W	G	Q	Y	G	E	S	E	6,1	[46]
OXA-11									S			D								6,4	[36]
OXA-13	T	S		N	S	S								P		G	N	A		[64]	
OXA-14												D								6,2	[24, 62]
OXA-16							T					D								6,2	[25]
OXA-17						S														6,1	[27]
OXA-19	T	S		N		S					D			F		G	N	A	7,5	[63]	
OXA-28	T	S		N		S				G				F		G	N	A	8,1	[70]	
OXA-35	T	S		N		S								F		G	N	A	8	[6]	
OXA-2											D			L					7,7	[23]	
OXA-15										G									8	[26]	
OXA-32														I						[71]	
OXA-1			A		A				R							D				[75]	
OXA-31			V		P				G							L				[5]	
OXA-18*																				5,5	[68]
OXA-45*																					

* – Эти β -лактамазы имеют низкую гомологию (около 40%) с остальными ферментами ОХА

схожи между собой. Белковая глобула металло- β -лактамаз состоит из двух доменов, в каждом из которых имеется по два атома цинка. Оба домена имеют практически одинаковую топологию. Предполагается, что эти ферменты возникли в результате дупликации гена, кодирующего один из доменов [37].

Потенциально это самые опасные β -лактамазы, так как они способны эффективно гидролизовать карбапенемы – «последнюю линию обороны» при терапии β -лактамными антибиотиками.

ОСОБЕННОСТИ ПОЯВЛЕНИЯ НОВЫХ МУТАНТОВ β -ЛАКТАМАЗ И ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЯ

β -Лактамазы – наиболее многочисленная и крайне разнообразная группа ферментов, ответственных за устойчивость к β -лактамным антибиотикам. Характерной тенденцией последних 5–10 лет являются:

1. Появление все новых и новых мутантных форм этих ферментов, устойчивых к действию новых препаратов (включая цефалоспорины IV поколения и карбапенемы). Как уже отмечалось выше, от 30 до 50% новых ферментов были найдены в течение пяти последних лет.

2. Комбинация в одном штамме сразу нескольких типов резистентности. При выполнении работ по гранту РФФИ 02-04-49360 в 2003 г. нами было проверено более 800 штаммов из госпиталей и клиник Москвы, Санкт-Петербурга, Томска и Назрани на резистентность к β -лактамам. Среди отобранных 280 штаммов для дальнейших исследований более чем в 50% изолятов было обнаружено по две различных β -лактамазы (SHV + CTX-M или TEM + CEX-M), а у 12% штаммов одновременно присутствовали TEM, SHV и CTX-M.

3. Высокая скорость распространения новых мутантов во всем мире. В качестве примера можно привести β -лактамазу CTX-M, которую еще недавно практически не находили в Российской Федерации. По данным наших исследований, ферменты этой группы были обнаружены в 40% штаммов, полученных из клиник Москвы и Санкт-Петербурга – наиболее часто посещаемых городов России.

Исследования показали, что устойчивость к данному β -лактаму возникает уже через два-три месяца с момента его применения в клинике. Поэтому во многих госпиталях через каждые три месяца практикуют заменять использованный β -лактама на новый.

Появление мутантных β -лактамаз с несколькими фенотипами устойчивости требует разработки методов экспресс-диагностики типов резистентности. Это может быть сделано только с использованием методов генетической инженерии.

V. УСТОЙЧИВОСТЬ К ГЛИКОПЕПТИДАМ СРЕДИ *ENTEROCOCCUS SPP*

Гликопептидные антибиотики (ванкомицин и тейкопланин) традиционно используются при лечении энтерококковых инфекций, вызываемых штаммами микроорганизмов, устойчивых к β -лактамам антибиотикам. Однако и эти антибиотики, подобно β -лактамам, обладают только бактериостатическим действием в отношении энтерококков. Для достижения бактерицидного эффекта гликопептиды целесообразно комбинировать с аминогликозидами.

Несмотря на то что ванкомицин применяется в медицинской практике с начала 50-х годов, первое сообщение об устойчивости энтерококков к этому антибиотику появилось только в конце 80-х годов (Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* – VRE faecium). К настоящему времени описано 6 фенотипов энтерококков, устойчивых к гликопептидным антибиотикам (от А до Е и G), их характеристики представлены в табл. 2. Фенотипы D, E и G описаны у единичных штаммов, а наиболее широко распространены штаммы с фенотипами А и В.

Устойчивость энтерококков к ванкомицину опосредуется достаточно сложными механизмами. Механизм действия гликопептидных антибиотиков и механизм устойчивости к ним энтерококков схематически изображен на рис. 10. В норме гликопептиды связываются с концевым дипептидом D-Ala–D-Ala, входящим в состав дисахарид-пентапептида – предшественника пептидогликана – основного компонента клеточной стенки микроорганизмов. В результате такого связывания блокируются последние стадии синтеза пептидогликана – включения предшественника в растущую цепь этого полимера и образования поперечных шивок. У штаммов энтерококков, демонстрирующих фенотипы А и В, вместо дипептида D-Ala-D-Ala

Таблица 2
Характеристика ванкомицинустойчивых энтерококков

Параметр	Фенотип					
	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG
МПК ванко	64–1,000	4–1,024	2–32	128	16	12–16
МПК тейко	16–512	<0,5	<0,5	4	0,5	0,5
Микроор- ганизм	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Подвижность генетических детерминант	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Нет

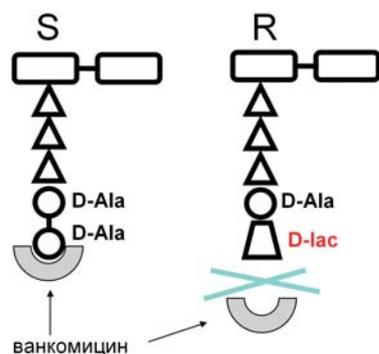


Рис. 10. Механизм устойчивости к ванкомицину у *Enterococcus* spp.

S и R-чувствительный и резистентный к ванкомицину штаммы, соответственно.

гена *VanS* является сенсором присутствия ванкомицина в окружающей среде, а продукт гена *VanR* – регулятором синтеза продуктов генов *VanA*, *VanH* и *VanX*. Синтез перечисленных генов носит индуцибельный характер, их экспрессия начинается только после воздействия на микроорганизм гликопептидного антибиотика. Белок *VanH* является дегидрогеназой, ответственной за синтез D-лактата, белок *VanA* осуществляет синтез дипептида D-Ala–D-lac, белок *VanX* разрушает нормальный дипептид D-Ala–D-Ala. Продукты генов *VanY* и *VanZ* не являются обязательными для проявления устойчивости к гликопептидам, хотя и оказывают некоторое влияние на ее выраженность.

Структура оперона, определяющего фенотип VanB, принципиально сходна со структурой оперона VanA, описанной выше (рис. 11). Выявлена почти 80%-ная гомология между генами, кодирующими ферменты синтеза модифицированного мономера. Однако в структуре генов, кодирующих регуляторные белки, найдены значительные отличия – степень гомологии составляет 25–35%. Этим, вероятно, можно объяснить тот факт, что у штаммов, демонстрирующих фенотип VanB, тейкопланин не индуцирует продукцию ферментов, синтезирующих модифицированный предшественник. В результате штаммы VanB фенотипа при переменном уровне устойчивости к ванкомицину сохраняют чувствительность к тейкопланину, что является отличительным признаком указанного фенотипа.

обнаруживается модифицированный предшественник, в состав которого входит дипептид D-Ala–D-Lac. Аффинность гликопептидов к D-Ala–D-Lac резко снижена.

У энтерококков с фенотипом VanA синтез модифицированного предшественника является результатом активности минимум 7 генов, входящих в состав оперона, локализованного на транспозоне Tn1546 (рис. 11). Указанный транспозон чаще локализуется на плазмидах, однако может находиться и в составе хромосомы. Два из входящих в оперон генов (*VanR* и *VanS*) кодируют систему регуляции экспрессии резистентности. Продукт

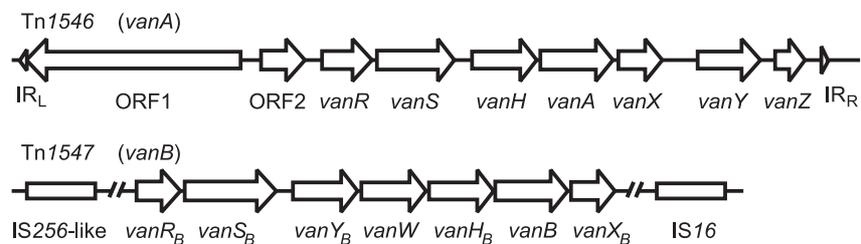


Рис. 11. Организация оперонов *vanA* и *vanB*, обеспечивающих устойчивость к ванкомицину у *Enterococcus* spp.

Фенотипы VanA и VanB распространены преимущественно среди *E. faecium*, но встречаются и среди *E. faecalis*.

К энтерококкам с фенотипом VanC относятся *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* и *E. flavescens*. Характерной особенностью данного фенотипа является низкий уровень устойчивости к ванкомицину при полной чувствительности к тейкопланину. Устойчивость к ванкомицину является видовым признаком перечисленных видов энтерококков. Механизм резистентности, как и у других энтерококков, связан с продукцией модифицированного мономерного предшественника пептидогликана. Однако в отличие от энтерококков фенотипов А и В в данном случае конечным дипептидом является D-Ala–D-Ser. Детерминанты, ответственные за синтез модифицированного предшественника, локализованы на хромосоме микроорганизмов. Среди энтерококков трех перечисленных видов встречаются штаммы с высоким уровнем устойчивости к ванкомицину. Этот феномен связан с приобретением в дополнение к генам кластера VanC подвижных генетических элементов (плазмид) с генами кластеров VanA или VanB.

Устойчивость энтерококков, демонстрирующих фенотип VanD, обусловлена продукцией предшественника с конечным дипептидом D-Ala–D-Lac, а у фенотипа VanE – с конечным дипептидом D-Ala–D-Ser.

Значение устойчивости энтерококков к гликопептидам для клиники до конца неясно. Так, например, анализ данных из 7 госпиталей показывает, что различия в летальности между группами пациентов, инфицированных чувствительными и устойчивыми микроорганизмами, колеблются от 2 до 44% [57]. Увеличение же летальности при инфекциях, вызываемых устойчивыми штаммами, во многом связано с наличием у пациентов тяжелой сопутствующей патологии.

VI. УСТОЙЧИВОСТЬ К β -ЛАКТАМАМ И ГЛИКОПЕПТИДАМ СРЕДИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Устойчивость к β -лактамам. Среди всех антибактериальных препаратов β -лактамы характеризуются наибольшим уровнем активности в отношении стафилококков, и на сегодня они составляют основу терапии соответствующих инфекций, поскольку обладают бактерицидным действием. Исторически первым антистафилококковым антибиотиком был природный бензилпенициллин, благодаря которому принципиально изменились результаты лечения соответствующих инфекций. Аминопенициллины, цефалоспорины I–II поколений и карбапенемы обладают практически такой же антистафилококковой активностью, как и пенициллин. Карбокси-, уреидопенициллины и цефалоспорины III поколения *in vitro* проявляют несколько меньшую активность, однако в клинике эти различия почти не заметны.

К сожалению, устойчивость к пенициллину, связанная с продукцией β -лактамаз, необычайно быстро распространилась среди стафилококков. Уже к середине 50-х годов в ряде стационаров Европы и Северной Америки более половины штаммов стафилококков проявляли устойчивость к пенициллину. Столь быстрое распространение устойчивости, скорее всего, связано с плазмидной локализацией генетических детерминант резистентности. Стафилококковые β -лактамазы представляют однородную группу ферментов, практически не различающихся по основным свойствам. Все они обладают одинаковым субстратным профилем, гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины за исключением метициллина и изоксазолилпенициллинов (оксациллина, клоксациллина, диклоксациллина). Стафилококковые β -лактамазы эффективно ингибируются клавуланатом, сульбактамом и тазобактамом.

Производство ферментов носит индуцибельный характер, общее же количество вырабатываемых лактамаз, вероятно, зависит и от копийности плазмиды, несущей ген фермента. Штаммы – гиперпродуценты β -лактамаз иногда частично гидролизуют цефалоспорины I поколения, что приводит к умеренной устойчивости стафилококков к этим препаратам. Значимого гидролиза метициллина и оксациллина, защищенных пенициллинов, цефалоспоринов II–IV поколений и карбапенемов не наблюдается. Однородность свойств стафилококковых β -лактамаз и их предсказуемость позволяет прогнозировать большинство свойств штаммов стафилококков по результатам детекции этих ферментов без непосредственной оценки чувствительности к другим β -лактамам антибиотикам.

Первым β -лактамом, устойчивым к гидролизу стафилококковыми β -лактамазами, был метициллин, внедренный в медицинскую

практику в 1959 г., однако уже в 1961 г. появились сообщения о выделении штаммов стафилококков, устойчивых к этому антибиотику [51]. Механизм этого явления долгое время оставался неясным, однако достаточно быстро было установлено, что метициллинрезистентность связана с неудачами лечения всеми β -лактамами антибиотиками. По существу, устойчивость к метициллину является маркером устойчивости ко всему классу β -лактамов антибиотиков. Метициллин в настоящее время практически не применяется, его место занял аналогичный по свойствам препарат оксациллин, но термин «метициллинрезистентность» сохранился (в качестве синонима употребляют термин «оксациллинрезистентность»).

Механизм устойчивости стафилококков к метициллину был расшифрован в начале 80-х годов. Он оказался связанным с приобретением микроорганизмами дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ2а или ПСБ2'), обладающего пониженной аффинностью к β -лактамам антибиотикам. ПСБ2а кодируется геном *mecA*, входящим в состав подвижного генетического элемента «стафилококковой хромосомной кассеты *mec*» (*staphylococcal cassette chromosome mec* – *SCCmec*) [43, 47]. Происхождение *SCCmec* не известно. Обнаружена определенная гомология между геном *mecA* и геном одного из пенициллинсвязывающих белков *Staphylococcus sciuri* [95]. Однако этот факт не вносит ясности в происхождение и механизм метициллинрезистентности, поскольку данный микроорганизм чувствителен к β -лактамам.

Вполне вероятно, что первыми стафилококками, получившими *SCCmec*, были *S. haemolyticus* и только в последующем произошла передача этого элемента другим коагулазонегативным стафилококкам и *S. aureus* [3]. Широкое распространение клонов метициллинрезистентных стафилококков возможно связано с селективным пресингом β -лактамов антибиотиков.

В течение многих лет метициллинрезистентные стафилококки рассматривались исключительно как госпитальные патогены, однако в последнее время ситуация изменилась в худшую сторону, так как эти патогены все чаще вызывают внебольничные инфекции [35, 67]. Выход устойчивых штаммов, первоначально возникших в лечебных учреждениях, за пределы стационаров является общей закономерностью. При тщательном анализе удается установить, что колонизация здоровых людей метициллинустойчивыми штаммами в значительной мере связана с такими факторами, как пребывание в стационаре даже в отдаленном прошлом, посещение лечебных учреждений по самым различным поводам, контакт вне стационаров с работниками здравоохранения [79].

Устойчивость к гликопептидам. В течение многих лет основными антибиотиками, эффективными при инфекциях, вызываемых метициллинрезистентными стафилококками (МРС), были гликопептиды. Существенным недостатком гликопептидов по сравнению с β -лактамами является то, что в отношении стафилококков они обладают лишь бактериостатическим действием. В тех случаях, когда гликопептиды по различным причинам назначали для лечения инфекций, вызванных метициллинчувствительными стафилококками, их клиническая эффективность оказывалась значительно ниже, чем у β -лактамов, особенно при таких инфекциях как эндокардиты [56]. Перечисленные факты позволяют рассматривать эту группу антибиотиков как субоптимальную для лечения стафилококковых инфекций. Однако при инфекциях, вызываемых метициллинустойчивыми штаммами, эти препараты являются средствами выбора, из-за высокой частоты ассоциированной устойчивости указанных патогенов к антибиотикам других классов.

Долгое время среди стафилококков не обнаруживали штаммы, резистентные к гликопептидам. Впервые такая устойчивость была найдена у коагулазонегативных стафилококков [81]. Среди штаммов *S. haemolyticus* устойчивость к гликопептидам распространена шире, чем среди штаммов *S. epidermidis*. Механизмы резистентности у коагулазонегативных стафилококков детально не изучены.

В 1996 г. в Японии были выделены штаммы *S. aureus* [41, 43] с пониженной чувствительностью к ванкомицину. В последующие годы подобные штаммы были выделены и в других географических регионах. МПК ванкомицина в отношении таких штаммов колеблется в пределах 8,0–16,0 мкг/мл (vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* или glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus* – VISA или GISA). При лечении ванкомицином инфекций, вызываемых такими микроорганизмами, наблюдались неудачи. Снижение чувствительности к ванкомицину связано с усилением синтеза пептидогликана и уменьшением образования поперечных сшивок. Клеточная стенка у штаммов GISA значительно толще, чем у чувствительных штаммов. В результате описанных изменений значительная часть ванкомицина связывается в верхних слоях клеточной стенки и не достигает мишени действия.

Наряду с описанным механизмом устойчивости в ряде экспериментов была показана возможность передачи стафилококкам от энтерококков плазмиды, кодирующей детерминанты резистентности высокого уровня к ванкомицину [65], однако в клинике такой феномен долго не обнаруживали. Только в 2002 г. с небольшим интервалом появились два сообщения из США о выделении в различных географических регионах страны (Пенсильвания и Мичиган) штаммов *S.*

aureus с высоким уровнем устойчивости к ванкомицину [19, 20]. У выделенных штаммов был обнаружен ген *vanA*, характерный для ванкомицинустойчивых энтерококков. Вероятно, что ранее наблюдавшийся в эксперименте феномен передачи от энтерококков к стафилококкам плазмиды, кодирующей устойчивость к ванкомицину, произошел и в клинике.

ВИ. УСТОЙЧИВОСТЬ К ФТОРХИНОЛОНАМ СРЕДИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Мишенью действия хинолонов являются бактериальные топоизомеразы — топоизомераза IV и ДНК-гираза — ферменты, осуществляющие изменение пространственной конфигурации молекулы ДНК на различных этапах ее репликации. Каждый из ферментов состоит из четырех субъединиц. Так, ДНК-гираза состоит из двух субъединиц *gyrA* и двух субъединиц *gyrB* (соответствующие гены *gyrA* и *gyrB*). Топоизомераза IV — из субъединиц *parC* и *parE* (соответствующие гены *parC* и *parE*). Гены обоих ферментов локализованы на бактериальной хромосоме. Топоизомераза IV осуществляет разрезание на отдельные хромосомы формирующуюся в ходе репликации линейную молекулу ДНК. Одна из основных функций ДНК-гиразы заключается в снятии напряжения, возникающего впереди репликационной вилки в результате расплетания двойной спирали ДНК в ходе репликации. Ключевую роль в связывании ДНК с активным центром ДНК-гиразы играет молекула тирозина в 122 положении субъединицы А фермента. В присутствии АТФ ДНК-гираза осуществляет разрыв двухцепочечной молекулы ДНК, пропускает через образовавшийся промежуток двойную спираль и вновь сшивает разделенные нити. Таким образом, в молекулу ДНК вводится виток отрицательной суперспирализации и снимается топологическое напряжение, возникающее впереди движущейся репликационной вилки.

Модель действия хинолонов на примере связывания ципрофлоксацина с комплексом ДНК-гираза–ДНК приведена на рис. 12 [40]. Хинолоны, обладая низкой аффинностью к свободным молекулам топоизомеразы или ДНК, проявляют высокое сродство к комплексу ДНК–фермент. Участок связывания хинолонов с комплексом ДНК–фермент получил название «хинолоновый карман». Необходимо вновь подчеркнуть, что в формировании «хинолонового кармана» принимают участие все субъединицы фермента и молекула ДНК. После попадания хинолона в карман продвижение ДНК-гиразы вдоль молекулы останавливается, а затем останавливается и продвижение

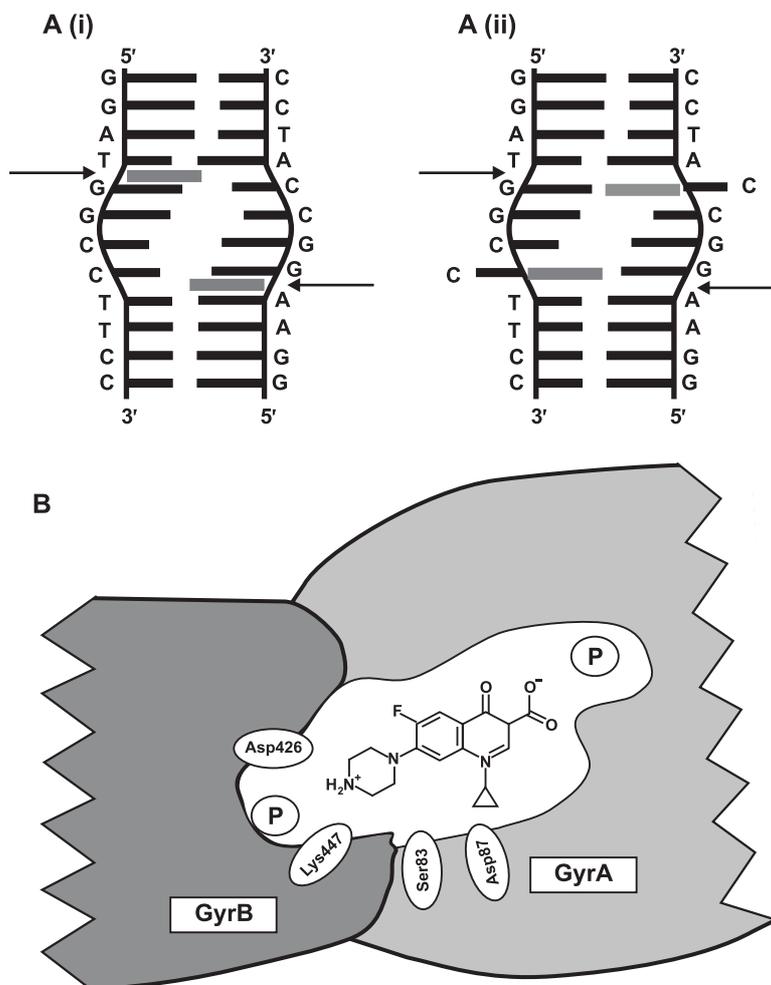


Рис. 12. Модель «хинолонового кармана» [40].

А. Взаимодействие хинолонов с молекулой ДНК, находящейся в активном центре фермента. Участки разрыва двойной спирали отмечены стрелками. Препарат представлен в виде серых прямоугольников. Предполагаемые варианты: А(i) – встраивание молекулы хинолона между нуклеотидами; А(ii) – вытеснение цитозина.

В. Хинолоновый карман в молекуле ДНК-гиразы. Ось ДНК перпендикулярна к плану рисунка. Выделены аминокислотные остатки в субъединицах А и В, критичные для взаимодействия с молекулой хинолона.

репликационной вилки. В результате останавливается весь процесс репликации. Кроме того, в силу не совсем ясного механизма происходят разрывы двухцепочечной молекулы ДНК, с которыми и связывают летальный эффект хинолонов.

Основным механизмом устойчивости к хинолонам является снижение аффинности препаратов к комплексу ДНК-фермент. Снижение аффинности происходит в результате спонтанных мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в полипептидных цепях ДНК-гиразы или топоизомеразы IV. Для снижения аффинности к хинолонам важны лишь мутации, возникающие на участках полипептидных цепей, входящих в состав «хинолонового кармана». Участки получили название «область, детерминирующая устойчивость к хинолонам». Размер этой области у субъединицы A ДНК-гиразы кишечной палочки составляет около 40 аминокислот. При этом замены некоторых аминокислот приводят к наиболее выраженному снижению аффинности и, соответственно, к максимальному снижению чувствительности. Так, у *E. coli* замена серина в 83-м положении является наиболее частой мутацией, приводящей к формированию устойчивости [29, 30, 93].

Частота мутаций, скорее всего, не зависит от воздействия фторхинолонов и составляет 10^{-6} – 10^{-10} . На фоне действия фторхинолонов *in vitro* или *in vivo* происходит лишь селекция устойчивых микроорганизмов в результате подавления размножения чувствительных. Вполне очевидно, что выживание мутантных штаммов возможно лишь в том случае, если уровень приобретенной резистентности окажется выше той концентрации препарата, на фоне которой велась селекция. Соответственно, чем выше концентрация препарата, при которой ведется селекция, тем менее вероятно формирование устойчивости. При определенных концентрациях хинолонов селекции устойчивых мутантов вообще не происходит. Такие концентрации получили название «концентрации, предотвращающие мутации» (mutation prevention concentration – MPC).

Поскольку топоизомеразы выполняют различные функции, то для подавления жизнедеятельности микробной клетки достаточно ингибировать активность только одного фермента, активность же второго может сохраняться. Эта особенность объясняет тот факт, что для всех хинолоновых препаратов можно выделить первичную и вторичную мишень действия. Первичной мишенью является тот фермент, к которому данный хинолон проявляет наибольшее сродство.

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

ция менее однозначна из-за существенных противоречий между результатами, получаемыми биохимическими и генетическими методами. Из результатов биохимических исследований следует, что у *S. pneumoniae* первичной мишенью действия для большинства хинолонов является топоизомераза IV. Ситафлоксацин и клинафлоксацин обладают приблизительно одинаковой аффинностью к обоим ферментам. По данным же, полученным с помощью генетических методов, у спарфлоксацина, моксифлоксацина и гатифлоксацина первичной мишенью является ДНК-гираза. Гемифлоксацин, ситафлоксацин и клинафлоксацин обладают, по-видимому, приблизительно одинаковым сродством к обоим ферментам.

В связи с наличием у хинолонов двух мишеней действия устойчивость к ним формируется ступенеобразно. После возникновения и селекции мутаций в генах фермента, являющегося первичной мишенью, антибактериальный эффект проявляется за счет подавления активности второго фермента, являющегося вторичной мишенью. Если воздействие хинолонов на микроорганизм продолжается, то возможно возникновение и селекция мутаций во вторичной мишени и, как следствие, дальнейшее повышение МПК. У штаммов микроорганизмов с высоким уровнем устойчивости обычно обнаруживают несколько мутаций в генах обоих топоизомераз.

Фторхинолоны, обладающие приблизительно одинаковым сродством к обоим топоизомеразам, по-видимому, в наименьшей степени способствуют селекции резистентности. Это связано с тем, что для формирования устойчивого штамма мутации должны произойти одновременно в генах обоих ферментов, вероятность же двойных мутаций существенно ниже, чем одиночных.

Устойчивость к фторхинолонам может быть также связана с активным выведением этих препаратов. Активное выведение антибактериальных препаратов (в том числе фторхинолонов) из внутренней среды бактерий осуществляют сложные белковые структуры (транспортные системы, эффлюксные насосы – *efflux pumps*), локализованные в цитоплазматической и внешней мембранах микробной клетки. Устойчивость такого типа получила широкое распространение среди грамотрицательных бактерий. У грамположительных она встречается реже и, как правило, не достигает высокого уровня. В наибольшей степени активному выведению подвержен норфлоксацин, в меньшей – ципрофлоксацин и офлоксацин. Левофлоксацин, спарфлоксацин и другие новые фторхинолоны практически не выводятся.

VIII. УСТОЙЧИВОСТЬ К МАКРОЛИДАМ, КЕТОЛИДАМ, ЛИНКОЗАМИДАМ И СТРЕПТОГРАМИНАМ_B (ГРУППА МКЛС)

Перечисленные антибактериальные препараты существенно различаются по своей химической структуре, но их объединяет общий механизм антибактериального действия и механизмы резистентности. Макролиды и кетолиды близки по структуре молекулы, основу которой составляет макролактонное кольцо. В зависимости от размеров этого кольца макролиды подразделяют на 14-ти (эритромицин, олеандомицин, кларитромицин, рокситромицин), 15-ти (азитромицин) и 16-членные (джозамицин, мидекамицин и спирамицин) [16, 77]. Классификация имеет значение для обсуждения механизмов устойчивости.

Механизм действия антибиотиков указанной группы основан на ингибировании биосинтеза белка в результате связывания с 50S субъединицей рибосомы. Установление структуры бактериальной рибосомы позволило значительно продвинуться в понимании как механизма действия, так и механизмов устойчивости.

Препараты группы МКЛС связываются с доменами II и V рРНК. Основным участком связывания антибиотиков является домен V, причем основные точки связывания – нуклеотиды в положениях A2058, A2059 и G2505, хотя недавно обнаружено связывание и по некоторым другим позициям. В пределах домена II антибиотик взаимодействует с нуклеотидом в положении A752, что наиболее характерно для кетолидов, и этим объясняют их более высокую антибактериальную активность, а также отсутствие перекрестной устойчивости с макролидами [39]. Связь с 23S рРНК препятствует сборке 50S субъединицы и процессу элонгации.

Хотя антибиотики группы МКЛС активны в отношении широкого спектра бактерий, однако на практике их обычно применяют против ряда грамположительных микроорганизмов – *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., атипичных патогенов – *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., а из грамотрицательных бактерий только в случае инфицирования *Helicobacter pylori*. Долгое время считалось, что низкая активность в отношении грамотрицательных бактерий связана с низкой проницаемостью этих антибиотиков через пориновые каналы, однако, очевидно, не менее важен и процесс их активного выведения из организма.

Устойчивость к препаратам группы МКЛС может быть связана с модификацией мишени действия, их активным выведением и быстрой инактивацией [54]. Однако наиболее распространенным и практически важным механизмом устойчивости является модификация

мишени действия. Модификация 23S рРНК осуществляется либо в результате метилирования аденина в положении 2058, либо в результате ряда нуклеотидных замен. Из двух приведенных механизмов наиболее распространенным и клинически важным является метилирование.

Метилирование (моно- или ди-) осуществляется семейством N⁶ метилтрансфераз, соответствующие гены которых получили название *erm* (erythromycin ribosome methylation). Метилирование приводит к снижению аффинности к мишени действия макролидных линкозамидных и стрептограминовых антибиотиков (MLS_B фенотип) [91]. В настоящее время у различных бактерий описано около 40 *erm* генов, локализованных обычно на плаزمидах [91].

Известны два варианта экспрессии устойчивости, связанной с метилированием: конститутивный и индуцибельный. При конститутивном типе экспрессии синтез активной мРНК метилазы происходит независимо от наличия индукторов. Фенотипически это проявляется в перекрестной устойчивости к макролидам, линкозамидам и стрептограминам В; кетолиды при этом сохраняют активность. При индуцибельном типе экспрессии в отсутствие индуктора синтез мРНК метилазы не происходит до конца за счет образования шпильки. Синтез полноразмерной мРНК становится возможным в результате перестройки конформации мРНК после связывания с индуктором аттенуатора экспрессии. Способность отдельных антибиотиков индуцировать перестройку мРНК определяется в основном структурой аттенуатора, различающейся у отдельных видов бактерий.

Для практики важно, что у *Staphylococcus* spp. индуцирующей активностью обладают 14- и 15-членные макролиды. Таким образом, штаммы с индуцибельным характером экспрессии метилаз, устойчивые к указанным антибиотикам, сохраняют чувствительность к 16-членным макролидам и стрептограминам. У *Streptococcus* spp. индуцирующей активностью обладают все антибиотики группы МКЛС, однако у 16-членных макролидов, линкозамидов и стрептограминов индуцирующая активность незначительна. На практике это приводит к значительному разнообразию фенотипов [96].

Вторым, относительно недавно расшифрованным механизмом модификации мишени действия антибиотиков группы МКЛС являются мутации в генах рРНК и рибосомальных белков, приводящие к конформационным изменениям пептидилтрансферазного центра и, соответственно, к снижению аффинности препаратов (рис. 13) [89]. Детальная информация об известных мутациях в генах рРНК доступна на веб-сайте <http://ribosome.fandm.edu>. Мутации в генах рРНК являются основным механизмом устойчивости к макролидам

у *H. pylori*. Мутации в рибосомальных белках L4 и L22 также приводят к конформационным изменениям пептидилтрансферазного центра и снижению аффинности антибиотиков группы МКЛС [86].

Активное выведение антибиотиков у грамположительных бактерий осуществляется двумя транспортными системами: семейством ABC (АТР-binding-cassette) транспортеров и семейством MFS (the major facilitator superfamily). Субстратами для ABC транспортеров являются макролиды и стрептограммины, для MFS транспортеров – только 14- и 15-членные макролиды. Наиболее важно для клиники активное выведение при инфицировании *Streptococcus* spp, среди которых распространены гены *mef* (macrolide efflux), относящиеся к семейству MFS [22, 85].

У грамположительных и грамотрицательных бактерий встречаются также ферменты (эстеразы, гидролазы, трансферазы и фосфоорилазы), различающиеся по субстратной специфичности и инактивирующие отдельных представителей группы МКЛС.

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстрое распространение разнообразных механизмов резистентности ставит перед клинической медициной и фундаментальной биологией серьезные вопросы. На сегодняшний день для оптимизации антибактериальной терапии совершенно недостаточно оценить уровень антибиотикорезистентности микроорганизма – возбудителя инфекции, фенотипическими методами. При сходных фенотипах, но различных механизмах устойчивости, клиническая эффективность антибактериальных препаратов может существенно различаться. Для формирования стратегии антибактериальной терапии на национальном и региональном уровнях необходима также информация о динамике распространения отдельных механизмов резистентности. И, наконец, детальное знание молекулярных механизмов резистентности является необходимым условием для разработки новых антибактериальных препаратов и средств диагностики устойчивости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abraham, E.P., Chain, E. (1940) Nature, **373**, 837.
2. Ambler, R.P. (1980) Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci., **289**, 321–331.
3. Archer, G.L., Thanassi, J.A., Niemeyer, D.M., Pucci, M.J. (1996) Antimicrob. Agents Chemother., **40**, 924–929.
4. Arpin, C., Labia, R., Andre, C., Frigo, C., El Harrif, Z., Quentin, C. (2001)

- Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 2480–2485.
5. Aubert, D., Poirel, L., Chevalier, J., Leotard, S., Pages, J.-M., Nordmann, P. (2001) Antimicrob. Agents Chemother. **45**, 1615–1620.
 6. Aubert, D., Poirel, L., Ben Ali, A., Goldstein, F. W., Nordmann, P. (2001) J. Antimicrob. Chemother., **48**, 717–721.
 7. Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P.H., Philippon, A. (1998). Antimicrob. Agents Chemother., **42**, 2352–2358.
 8. Bauernfeind, A., Chong, Y., Schweighart, S. (1989) Infection, **17**, 316–321.
 9. Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., Sahly, H., Ullmann, U. (1999) Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 1924–1931.
 10. Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., Casellas, J.M. (1996) Antimicrob. Agents Chemother., **40**, 509–513.
 11. Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Giamarellou, H. (1996) Antimicrob. Agents Chemother. **40**, 221–224.
 12. Bauernfeind, A., Wagner, S., Jungwirth, R., Schneider, I., Meyer, D. (1997) Antimicrob. Agents Chemother., **41**, 2041–2046.
 13. Bonnet, R., Champs, C.D., Sirot, D., Chanal, C., Labia, R., Sirot, J. (1999) Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 2671–2677.
 14. Bradford, P.A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S.J., Rahal, J.J., Bush, K. (1997) Antimicrob. Agents Chemother., **41**, 563–569.
 15. Bradford, P.A. (2001) Clin. Microbiol. Rev., **14**, 933–951.
 16. Bryskier, A., Agouridas, C., Gasc, J.C. Classification of macrolide antibiotics. In: Microlides: chemical structure, pharmacological characteristics and application in clinic, Bryskier A. et al eds. Oxford, England: Blackwell, 1993, 5–66.
 17. Bush K. (1997) Ciba Found. Symp., **200**, 152–163.
 18. Cao, V.T., Arlet, G., Ericsson, B.M., Tammelin, A., Courvalin, P., Lambert, T. (2000) J. Antimicrob. Chemother., **46**, 895–900.
 19. CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. United States, 2002. MMWR 2002; **51**, 565–567.
 20. CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. United States, 2002. MMWR 2002, **51**, 902–903.
 21. Central Intelligence Agency. The global infectious disease threat and its implications for the United States. 1999. www.odci.gov/cia/publications/nie/report/nie99-17d.html.
 22. Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A.V., Bergeron, J., Reitsema, J.A. (1996) Mol. Microbiol., **22**, 867–879.
 23. Dale, J., Godwin, W. D., Mossakowska, D., Stephenson, P., Wall, S. (1985) FEBS Lett., **191**, 39–44.
 24. Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D., Livermore, D.M. (1995) Antimicrob. Agents Chemother., **39**, 1881–1884.
 25. Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D., Livermore, D.M. (1998) Antimicrob. Agents Chemother., **42**, 3117–3122.
 26. Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D., Livermore, D.M. (1997) Antimicrob. Agents Chemother., **41**, 785–790.
 27. Danel, F., Hall, L.M.C., Duke, B., Gur, D., Livermore, D.M. (1999) Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 1362–1366.
 28. Datta, N., Kontomichalou, P. (1965) Nature, 208, 239–244.
 29. Drlica, K, Zhao, X. (1997) Microbiol. Mol. Biol. Rev., **61**, 377–92.
 30. Drlica, K. (1999) ASM News, **65**, 410–15.
 31. Du Bois, S.K., Marriott, M.S., Amyes, S.G. (1995) J. Antimicrob. Chemother., **35**, 7–22.
 32. Fleming, P.C., Goldner, M., Glass, D.G. (1963) Lancet, **1**, 1399–1401.
 33. French, G.L. (1999) Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 1206–1210.

34. *Gazouli, M., Tzouveleakis, L. S., Vatopoulos, A.C., Tzelepi, E.* (1998) *J. Antimicrob. Chemother.*, **42**, 419–425.
35. *Gorak, E, Yamada, S, Brown, J.* (1999) *Clin. Infect. Dis.*, **29**, 797–800.
36. *Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M., Akalin, H.E.* (1993). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 1637–1644.
37. *Hall, B.G., Salipante, S.J., Barlow, M.* (2003) *J. Mol. Evol.*, **57**, 249–254.
38. *Hall, B.G., Barlow, M.* (2003) *J. Mol. Evol.*, **57**, 255–260.
39. *Hansen, L.H., Mauvais, P., Douthwaite, S.* (1999) *Mol. Microbiol.*, **31**, 623–631.
40. *Heddle, J., Maxwell, A.* (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1805–1815.
41. *Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S. Fukuchi, Y., Kobayashi, I.* (1997) *Lancet.*, **350**, 1670–1673.
42. *Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F.C.* (1997) *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 135–136.
43. *Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T.* (2001) *Trends Microbiol.*, **9**, 486–493.
44. *Horii, T., Arakawa, Y., Ohta, M., Sugiyama, T., Wacharotayankun, R., Ito, H., Kato, N.* (1994) *Gene*, **139**, 93–98.
45. *Huletsky, A., Couture, F., Levesque, R.C.* (1990) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1725–1732.
46. *Huovinen, P., Huovinen, S., Jacoby, G.A.* (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 134–136.
47. *Ito, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K.* (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1449–1458.
48. *Jacobs, C., Frere, J.-M., Normark, S.* (1997) *Cell*, **88**, 823–832.
49. *Jacoby, G.A., Tran, J.* (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1759–1760.
50. *Jaurin, B., Grundström, T., Edlund, T., Normark, S.* (1981) *Nature*, **290**, 221–225.
51. *Jevons, M.P.* (1961) *Br. Med. J.*, **1**, 124–125.
52. *Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S.* (1983) *Infection*, **11**, 315–317.
53. *Koshland, D.E., Jr, Neu H.C.* (1992) *Science*, **257**, 1064–1073.
54. *Leclercq, R.* (2002) *Clin. Infect. Dis.*, **34**, 482–92.
55. *Levesque, R., Roy, P.H., Letarte, R., Pechère, J.C.* (1982) *J. Infect. Dis.*, **145**, 753–761.
56. *Levine, D.P., Fromm, B.S., Reddy, B.R.* (1991) *Ann. Intern. Med.*, **115**, 674–80.
57. *Linden, P.K.* (1998) *Am. J. Med.*, **104**, S24–33.
58. *Livermore, D. M.* (1995) *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 557–584.
59. *Massova, I., Mobashery, S.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1–17.
60. *Medeiros, A. A.* (1984) *Br. Med. Bull.*, **40**, 18–27.
61. *Mitsuhashi, S., Inoue, M.* Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. *In: β -lactam antibiotics.* N.–Y.: Springer-Verlag, 1981, 41–56.
62. *Mugnier, P., Podglajen, L., Gutmann, L., Collatz, E.* (1994) *Program Abstr. 34th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, abstr. C98.
63. *Mugnier, P., Casin, I., Bouthors, A.T., Collatz, E.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 3113–3116.
64. *Mugnier, P., Podglajen, I., Goldstein, F.W., Collatz, E.* (1998) *Microbiology*, **144**, 1021–1031.

65. Noble, W.C., Virani, Z., Cree, R.G.A. (1992) FEMS Microbiol. Lett., **93**, 195–198.
66. Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., Jacoby, G.A. (1990) Antimicrob. Agents Chemother., **34**, 2200–2209.
67. Pate, K., Nolan, R., Bannerman, T., Feldman, S. (1995) Lancet; **346**, 978.
68. Philippon, L.N., Naas, T., Bouthors, A.-T., Barakett, V., Nordmann, P. (1997) Antimicrob. Agents Chemother., **41**, 2188–2195.
69. Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A. (2002) Antimicrob. Agents Chemother., **46**, 1–11.
70. Poirel, L., Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P. (2001) Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 447–453.
71. Poirel, L., Gerome, P., De Champs, C., Stephanazzi, J., Naas, T., Nordmann, P. (2002) Antimicrob. Agents Chemother., **46**, 566–569.
72. Poirel, L., Héritier, C., Podglajen, I., Sougakoff, W., Gutmann, L., Nordmann, P. (2003) Antimicrob. Agents Chemother., **47**, 755–758.
73. Prinarakis, E.E., Tzelepi, E., Gazouli, M., Mentis, A.F., Tzouvelekis, L.S. (1996) FEMS Microbiol. Lett., **139**, 229–234.
74. Prinarakis, E.E., Miriagou, V., Tzelepi, E., Gazouli, M., Tzouvelekis, L.S. (1997) Antimicrob. Agents Chemother., **41**, 838–840.
75. Ouellette, M., Bissonnette, L., Roy, P.H. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7378–7382.
76. Richmond, M.H., Sykes, R.B. (1973) Adv. Microb. Physiol, **9**, 31–38.
77. Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., Seppala, H. (1999) Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 2823–30.
78. Roth, T.A., Minasov, G., Morandi, S., Prati, F., Shoichet, B.K. (2003) Biochemistry, **42**, 14483–14491.
79. Salgado, C.D., Farr, B.M., Calfee, D.P. (2003) Clin. Infect. Dis., **36**, 131–139.
80. Sawai, T., Mitsuhashi, S., Yamagishi, S. (1968) Jpn. J. Microbiol., **4**, 423–434.
81. Siebert, W. T., Moreland, N., Williams T.W., Jr. (1979) J. Infect. Dis., **139**, 452–457.
82. Stapleton, P.D., Shannon, K.P., French, G.L. (1999) Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 1206–1210.
83. Strynadka, N.C., Adachi, H., Jensen, S.E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K., James, M.N. (1992) Nature, **359**, 700–705.
84. Sykes, R.B., Matthew, M. (1976) J. Antimicrob. Chemother., **2**, 115–157.
85. Tait-Kamradt, A., Clancy, J., Cronan, M., Dib-Hajj, F., Wondrack, L., Yuan, W., Sutcliffe, J. (1997) Antimicrob. Agents Chemother., **41**, 2251–2255.
86. Tait-Kamradt, A., Davies, T., Appelbaum, P.C., Depardieu, F., Courvalin, P., Petitpas, J., Wondrack, L., Walker, A., Jacobs, M.R., Sutcliffe, J. (2000) Antimicrob. Agents Chemother., **44**, 3395–3401.
87. Tzouvelekis, L.S., Bonomo, R.A. (1999) Curr. Pharm. Des., **5**, 847–864.
88. Tzouvelekis, L.S., Tzelepi, E., Tassios, P.T., Legakis, N.J. (2000) Int. J. Antimicrob. Agents, **14**, 137–143.
89. Vester, B., Douthwaite, S. (2001) Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 1–12.
90. Vila, J., Navia, M., Ruiz, J., Casals, C. (1997) Antimicrob. Agents Chemother., **41**, 2757–2759.
91. Weisblum, B. (1995) Antimicrob. Agents Chemother., **39**, 577–585.
92. Wiedemann, B., Dietz, H., Pfeifle, D. (1998) Clin. Infect. Dis. **27** (Suppl. 1), S42–S47.
93. Wiedemann, B., Heisig, P. (1994) Infection, **22** (suppl 2), S73–79.

-
94. World Health Organization. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva, 2001. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.
95. Wu, S., Piscitelli, C., de Lencastre, H., Tomasz, A. (1996) *Microb. Drug Res.*, **2**, 435–441.
96. Zhong, P., Cao, Z., Hammond, R., Chen, Y., Beyer, J., Shortridge, V.D., Phan, L.Y., Pratt, S., Capobianco, J., Reich, K.A., Flamm, R.K., Or, Y.S., Katz, L. (1999) *Microb. Drug Resist.*; **5**, 183–188.