

УДК 615.281.07

## Развитие антимикробной химиотерапии и новые парадигмы

А.М. Егоров, Ю.О. Сазыкин, В.П. Иванов

*Государственный научный центр антибиотиков, Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва, Россия*

### Evolution of Antimicrobial Chemotherapy and New Paradigm

A.M. Egorov, J.O. Sazikin, V.P. Ivanov

*National Research Centre of Antibiotics, Moscow, Russia, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow, Russia*

Развитие химиотерапии на строго научной основе стало возможным, естественно, только после работ Л. Пастера, то есть выявления объекта, на который должны воздействовать антимикробные агенты. Совершенно закономерно также, что периоду химиотерапии предшествовал период асептики и антисептики.

Возникновение антимикробной химиотерапии датируется довольно точно – первыми годами XX века и связано, как известно, с работами П. Эрлиха и его школы. Суть не в знаменитом препарате 606 (сальварсан) из ряда арсенобензолов, которого давно уже нет в фармакопеех мира. Восторженно встреченный, этот препарат сохранил свою объективную ценность, но постепенно был вытеснен из практики сначала неосальварсаном, полученным самим Эрлихом, а затем другими препаратами. Суть состоит в сформулированных Эрлихом тезисах, которые в течение 100 лет выглядели незыблемыми и лишь сейчас подвергаются осторожному пересмотру, причем с оговорками.

Как известно, Эрлих сформулировал ряд тезисов, которые сразу же приобрели значение парадигм, то есть воспринятых всем научным сообществом «образцов», или моделей решения проблемы, дающих реальный прообраз действительности. Смена парадигм по мере углубления знаний возможна, но она равносильна научной революции в конкретной области.

Основополагающие тезисы Эрлиха хорошо известны. Их анализ показывает, что Эрлих ставил во главу угла химиотерапевтический индекс антимикробного препарата [1]. В переводе, сделанном в 1910 г., стиль которого стал уже несколько архаичным для нашего времени, это выглядит так: «Хемотерапия ставит себе задачу найти такие вещества, которые при большом влиянии на паразитов принесли бы возможно менее вреда организму». И далее: «Средство в практику не выйдет, если взаимоотношение между ядовитостью и лечебной дозировкой неблагоприятно». Отсюда представление об идеальной по избирательности магической пуле, переходившее из учебника в учебник (*магическая пуля Эрлиха*).

За первую треть XX века после знаменитых препаратов Эрлиха арсенал антимикробной химиотерапии пополнился фактически только сульфаниламидами. Начиная же с 40-х годов наступило непрерывное внедрение в практику природных, синтетических и полусинтетических веществ разнообразной химической структуры с исключительно высокой биологической активностью. Последнее обстоятельство обусловило интерес к механизму их действия и на клеточном уровне, и на уровне суммарных биохимических процессов и, наконец, на молекулярном уровне.

Можно утверждать, что почти полвека решение задачи целенаправленного создания новых производных антимикробных агентов ставилось в зависимости от построения правильной модели взаимодействия прототипа с внутриклеточной мишенью. При этом мишень в микробной клетке подразумевалась как единственная (*парадигма избирательности*).

Контактный адрес:

Алексей Михайлович Егоров

113105, Москва, Нагатинская ул., За, ГНЦА

Факс: (095) 111-42-38

Ограниченность такого представления без учета хронобиологических закономерностей и закономерностей транспорта антибиотика в клетку, понятия промежуточных (временных) мишеней, без знания субклеточной и молекулярной топографии всей клетки стала ясна к середине 60-х годов.

Сложность организации клетки даже у прокариот позволяет утверждать, что абсолютизировать избирательность нельзя. Примером этому могут служить хотя бы три широко применяемых группы антимикробных агентов –  $\beta$ -лактамы, хинолоны и аминогликозиды.

$\beta$ -Лактамы и хинолоны имеют более одной мишени в микробной клетке (разные пенициллинсвязывающие белки, или же ДНК-гираза и ДНК-топоизомераза IV).

Аминогликозиды, в частности стрептомицин, также многозначны в своем взаимодействии с микрорганом:

- реагирование с 30S рибосомной субъединицей на стадии инициации белкового синтеза ведет к прекращению синтеза белка;

- реагирование с 30S рибосомной субъединицей на стадии элонгации полипептидной цепи ведет к синтезу «летальных» белков;

- взаимодействие с *oriC* локусом предотвращает репликацию ДНК.

К этому следует прибавить, что, реагируя с ионами магния внешней мембраны, стрептомицин «самопрототирует» свое проникновение в клетку. Наконец, он же вызывает частичную деструкцию цитоплазматической мембраны. Любая молекулярная модель «вне клетки», например модель взаимодействия стрептомицина с рибосомой, не сможет исчерпывающе объяснить механизм антимикробного эффекта этого антибиотика.

Обращают на себя внимание недавние (вторая половина 90-х годов) исследования в области макролидных препаратов. Оказалось, что рокситромицин, кларитромицин и азитромицин, по-видимому, обладают положительным эффектом при лечении атеросклероза, артритов и астмы – болезней инфекционной природы, согласно мнению, господствовавшему многие десятилетия.

В настоящее время ведутся дискуссии об этиологическом значении в этих заболеваниях внутриклеточно локализованных бактерий, в частности хламидий. По мнению ряда авторов, именно в этом следует искать причину эффективности данных антибиотиков.

Однако существует и иная точка зрения: эффективность макролидов объясняется коррекцией ими «чрезмерных» воспалительных реакций, обусловленных полиморфноядерными нейтрофилами и мо-

ноцитами, поскольку указанные макролиды обнаруживаются в высоких концентрациях в фагоцитах [2].

Таким образом, можно говорить о смене парадигм или в патологии, или в химиотерапии. Положительным качеством определенных антибиотических структур оказывается именно отсутствие строгой избирательности действия. Следует также отметить, что не обладающий прямым действием на опухоли кларитромицин в последние годы обратил на себя внимание как противоопухолевый препарат. Его механизм действия реализуется, по-видимому, на уровне интерлейкинов [2, 3].

Вообще можно указать, что с 90-х годов прошлого века не прекращаются систематические попытки сочетать в одной низкомолекулярной структуре два качества – *антибактериальную* и *иммуномодулирующую* активность. Пока наиболее удачным результатом такого целенаправленного поиска считается цефодизим. На основе цефалоспориновой структуры получен лекарственный препарат, действующий (на клеточном уровне) на две мишени – бактерию и фагоцит и обладающий антибактериальным и иммуностимулирующим эффектом [2, 4].

Предлагается ретроспективный анализ огромного перечня антибиотиков с целью выявления среди них фармакологически активных веществ или способных стать прототипом для веществ такого рода, которые могут быть получены путем химической модификации. Конечно, при этом не ставится, как всегда, обязательная задача сохранения антимикробной активности.

Так, например, ведутся поиски производных эритромицина и циклоспорина А, обладающих, соответственно, мотилиноподобным действием (стимуляция перистальтики кишечника) и способностью возвращать фенотип резистентной опухолевой клетки к чувствительному. При этом декларируется (как желательная) потеря антибактериальной или иммуносупрессорной активности, присущей прототипам.

Воззрения Эрлиха были единственно правильными на том уровне знаний, который был доступен в начале XX века. Смена парадигм в химиотерапии обуславливается сейчас достижениями фундаментальных наук, приведшими к гораздо более глубокому пониманию взаимодействия лекарства с патогеном в инфицированном организме. Многого ожидается также от *комбинаторной химии*, *геномики* и *протеомики* (протеом – полный набор или совокупность белков в клетке).

Комбинаторная химия конструирует новые структуры, используя «принцип подобия» – из фрагментов, биологическая активность которых «в том или ином направлении» была уже доказана.

Необходимость анализа количественной корреляции структурно-функциональных отношений не требует доказательств.

Есть приемы для повышения эффективности работы по созданию ряда веществ с запланированным многообразием. Однако изменение функции веществ в одном случае, например, при взаимодействии с конечной мишенью, еще не означает решения вопроса о создании лекарства. Требуется учет взаимодействия с промежуточными мишенями и т. д.

Ретроспективный анализ работ по созданию рационального молекулярного дизайна, например фторхинолонов, создает впечатление глубокого систематического предвидения результатов экспериментов. В реальности систематического продвижения на пути от налидиксовой кислоты к современным фторхинолонам не было, во всяком случае применительно к созданию принципиально новых рядов.

В последние годы ведется все более оживленная дискуссия о возможностях, которые открываются перед химиотерапией за счет использования геномики и протеомики. Осуществлено полное секвенирование генома многих патогенных бактерий. Международные базы данных, располагающие особенно подробными сведениями о геномах так называемых «модельных» микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и др.), а также о геноме эукариот низших и высших, в состоянии быстро давать информацию из области структурной, сравнительной и метаболической геномики [5, 6]. Это позволяет идентифицировать у патогенов гены, включенные в известные метаболические процессы, дифференцировать гены с еще неизвестными функциями.

Аmplификация интересующего исследователя гена с помощью полимеразной цепной реакции, использование в последующем систем транскрипции и трансляции позволяют выявить кодируемый им продукт и установить его функцию на уровне фенотипа. Таким образом, создается возможность проверки активности рядов как синтетических, так и природных веществ в качестве ингибиторов функций конкретных генов, точнее – кодируемых ими продуктов. Иными словами, отбор и изучение новых антимикробных агентов идет не от организма к гену, а от гена к организму в соответствии с введенным сейчас в литературу термином «*обратная генетика*».

Успехи геномики (и генной инженерии) позволяют выявлять гены, необходимые патогену при его размножении только в инфицированном организме и вести затем поиск ингибиторов функций их продуктов. Так, с недавнего времени получила извест-

ность система «*In Vivo Expression Technology*» (IVET), используемая для отбора генов вирулентности (*ivi* гены) [7, 8].

Геном исследуемого патогена фрагментируется с помощью набора рестриктаз: в отдельных фрагментах оказываются или *ivi* гены, или «жизненно важные» гены. Последние необходимы клетке для ее роста и *in vivo*, и *in vitro*.

Ингибиторы их функций могут быть выявлены и на искусственной питательной среде, то есть известными путями. Гены же вирулентности, мало изученные вообще, представляют, как мишени для химиотерапевтического агента, особый интерес, поскольку патоген, потерявший вирулентность, будет быстро уничтожаться защитными силами организма.

Система IVET, основанная на захвате промотора тех генов, которые экспрессируются только *in vivo*, позволила обнаружить, например, у сальмонеллы примерно 1% таких генов. Системы обнаружения *ivi* генов, основанные на разных подходах, разрабатываются в разных лабораториях. В число генов вирулентности входят не только гены, кодирующие образование адгезинов, инвазинов и т. п., но и гены, позволяющие микроорганизму переносить дефицит необходимых веществ в макроорганизме, например, гены системы транспорта железа, реутилизации пуринов.

Несомненно, что на парадигмах современной химиотерапии, а точнее – химиотерапии ближайшего будущего должно сказаться развитие протеомики [9, 10, 11].

Протеомика в обязательном сочетании с молекулярной биологией, геномикой и белковой химией знаменует качественно новое углубление знаний во всех областях биологии, в том числе и микробиологии. Как правило, в статьях, посвященных вопросам протеомики, подчеркивается, что ее развитие становится возможным. Более того, оно неизбежно именно в «постгеномную» эру.

Если геномика основана на дифференциации каждого гена из их совокупности в геноме и его характеристике в разных аспектах с использованием баз данных, то протеомика – на дифференциации и характеристике клеточных белков также с использованием баз данных.

Протеомика, говоря с некоторой долей условности, ближе к познанию фенотипа клетки, выращиваемой в конкретных условиях или находящейся под воздействием тех или иных стрессовых факторов. Обнаружение гена само по себе еще не означает, что он экспрессируется в любом случае, то есть что его продукт должен приниматься во внимание всегда. В то же время обнаружение кодируемого ге-

ном продукта и определение его количества, как правило, должно учитываться при характеристике свойств клетки.

Стандартный анализ протеома начинается с извлечения растворимых белков и их разделения и визуализации методом двумерного электрофореза в геле. Индивидуальный белок после предварительной обработки анализируется методами масс-спектрометрии или другими методами (капиллярная жидкостная хроматография). Идентификация белков осуществляется с использованием опять-таки соответствующих баз данных.

Такая методология позволяет уловить ответ клетки по качественным и количественным изменениям белковой экспрессии на всевозможные внешние воздействия, включая реакцию на добавленный антибиотик, на факторы иммунитета; улавливаются также по характеру белковой экспрессии изменения, ведущие к патогенности, антибиотикорезистентности и т. д.

Одна из важных задач протеомики – контроль за посттрансляционными модификациями белков. С помощью баз данных привлеченные к себе внимание белки классифицируются по функциям, внутриклеточной локализации и другим показателям, характеризующим их роль.

Техника двумерного электрофореза требует, однако, в ряде случаев усовершенствования. Например, ведется поиск особых приемов для улучшения идентификации гидрофобных (связанных с мембранными структурами) белков.

Актуальным является уменьшение трудоемкости анализа совокупности белков микробной клетки, поскольку в ней насчитывается несколько тысяч индивидуальных белков. Тем не менее уже достигнута идентификация в одном эксперименте около 2000 белков.

В последнее время стала развиваться количественная протеомика, позволяющая количественно сопоставлять экспрессию отдельных белков. В целом протеомика не только дополняет геномику, ее направление, которое получило название «метаболической» или «функциональной», но и является этапом (не последним) приближения к пониманию клетки как единой динамичной совокупности макромолекулярных структур.

Возможно, что в будущем предстоит терминологическое оформление и «постпротеомной» эры, когда предметом внимания окажется состав и количественное соотношение (на данный момент ростового цикла) всех низкомолекулярных метаболитов – продуктов ферментативных реакций. Учитывая, что реалии химиотерапии очень часто базируются на препаратах, являющихся аналогами ферментных

субстратов, можно также ожидать принципиально-го вклада в химиотерапию будущего.

Интересно отметить, что основополагающие факторы, касающиеся механизма действия пенициллина, как потом оказалось, применимые и к другим  $\beta$ -лактамам антибиотикам, были получены более чем за треть века до формирования протеомики именно в соответствии с методологией этой, неизвестной тогда, научной дисциплины. В тот период, когда было установлено, что пенициллин, являясь ингибитором D-аланинтранспептидазы, прекращает образование пептидогликана клеточной стенки у бактерий, и когда внимание сосредоточилось на пенициллине как аналоге субстрата в активном центре этого фермента, совершенно неожиданно возник новый, как будто бы излишний, термин – «пенициллинсвязывающие белки».

Методами электрофореза (в сочетании с радиоизотопными) была показана необходимость учета топографии всей микробной клетки при установлении механизма действия  $\beta$ -лактамов. Множественность D-аланинтранспептидаз, одинаковых по каталитической функции, но не по молекулярной массе и другим физико-химическим свойствам, отвечающих за завершение синтеза пептидогликана на полюсах клетки, или при формировании клеточной перегородки, или при удлинении палочковидных форм, оказалась крайне важной. Они обладали неодинаковым сродством к разным  $\beta$ -лактамам. В конечном счете это сыграло определяющую роль в том, что  $\beta$ -лактамы стали наибольшей по разнообразию и значимости группой антибиотиков.

Роль протеомики в химиотерапии в будущем может быть связана с решением многих проблем, стоящих перед наукой. В качестве примера следует указать на назревшую необходимость изучения методами протеомики клеток *Helicobacter pylori* при микрорезволюции этого патогена в инфицированном организме [12].

Известно, что культура *H. pylori* при стрессовой ситуации *in vivo* дифференцируется как бы на две субпопуляции – одна часть клеток гибнет и лизируется, другая же часть адаптируется и поглощает ДНК, освободившуюся из лизировавшихся клеток. Предполагается, что общий сигнал для популяции – «*quorum santis*» – обеспечивает выживание культуры в трудных условиях за счет обогащения генома компетентных клеток. Однако для того чтобы подтвердить биологическое значение этого явления требуется изучить экспрессию поглощенных генов, используя методы протеомики, в частности количественной.

Широкое использование подходов со стороны не только геномики, но и протеомики необходимо

для выяснения причин современной эпидемии туберкулеза. Это относится как к характеристике протеома клеток микобактерий, например, доказательство реальности компенсаторных мутаций и изучение их фенотипического выражения, так и к проблеме гетерогенности человеческой популяции в отношении восприимчивости к туберкулезу [13].

Число таких приложений методологии протеомики непосредственно к решению задач химиотерапии велико. Целесообразно тем не менее упомянуть о протеомике применительно к биогенезу вторичных метаболитов с антибиотическими свойствами у актиномицетов. Проблема экспрессии «молчащих» генов, включенных в биогенез антибиотических структур, может быть очень важна для пополнения перечня природных химиотерапевтических веществ.

Напрашивается возможность сопоставления генов, экспрессия которых играет роль в приспособлении патогенного микроорганизма к действию неблагоприятных факторов *in vivo*, и в приспособлении почвенного микроорганизма к меняющейся внешней среде.

Проблема становится, таким образом, общебиологической. Прикладные же цели здесь разные: поиск генов, то есть их белковых продуктов как новых мишеней для химиотерапевтических веществ, и поиск генов, то есть кодируемых ими ферментов, включенных в биогенез еще не описанных химиотерапевтических агентов.

Как следует из всего изложенного, ведущую роль в каждом новом направлении, от которого ожидается прогресс антимикробной химиотерапии, играют не микробиологи. В одном случае – это химики-органики и биоорганики, в другом – генетики, в частности генные инженеры, в третьем – специалисты по белковой химии и биохимии. Используя методологию комбинаторной химии, геномики и протеомики, они с полным основанием указывают на реальность новых подходов к получению антимикробных агентов.

И все же самая блестящая разработка теоретических основ этих подходов еще не означает непосредственного вклада в практику. Последний может задержаться из-за недостаточного внимания к особенностям микробной клетки в целом и особенностям конкретного патологического процесса.

Образно говоря, намерения фундаментальных наук декларированы, а мощь их методологии продемонстрирована. Настала очередь существенного

практического вклада в решение актуальных проблем химиотерапии.

Как своего рода образец для сравнения поисковых стратегий, разделенных полувекровым периодом, и в связи с недавно отмеченным 50-летним «юбилеем цефалоспоринов» небезынтересно вернуться к истории открытия цефалоспоринов С [14, 15]. Она является примером самоотверженного труда без далекоидущих теоретических построений: в то же время цефалоспорины четырех поколений являются полусинтетическими вариантами этого цефалоспоринов. Его открытие – цепь случайностей и счастливого выбора правильного направления исследований.

Ошибочная в целом концепция самоочищения морской воды за счет антибиотиков, образуемых морскими микроорганизмами, в сочетании с отсутствием заболеваний брюшным тифом у купающихся вблизи места сброса сточных вод привели к обнаружению в Сардинии гриба – продуцента цефалоспоринов С.

Этот антибиотик малоактивен вообще и совершенно неактивен против возбудителя брюшного тифа. Образовывался он в малых количествах и был к тому же «замаскирован» присутствием антибиотических тритерпеновых структур (уже известных к тому времени) и пенициллина N. Он был выделен как случайно обнаруженная микропримесь в препаратах пенициллина N. Его ценность сама по себе отсутствовала, и понадобилось проявить интуицию и энтузиазм, чтобы изучать эту структуру.

Как вспоминал многие годы спустя один из авторов препарата Э. Абрахам, только чудо могло решать все новые и новые проблемы, с которыми сталкивались на пути к цефалоспориновым (не зная, что со временем цефалоспорины составят не менее половины применяемых в клинике антимикробных антибиотиков). Здесь же Э. Абрахам отдал должное правильной организации прикладной науки: «Успех – в интуиции, терпеливости и готовности идти на риск фармацевтических компаний» [14].

Действительно, первоначальное финансирование университетских исследований (в Оксфорде) было дополнено после подтверждения ценности препарата непосредственным участием на поздних стадиях его разработки лабораторий фирмы «Lilly».

Создание принципиально новых лекарственных препаратов инновационными путями в XXI веке будет, несомненно, наиболее успешным при интернационализации исследований.

## Л и т е р а т у р а

1. Сазыкин Ю.О. П. Эрлих и начало современной анти-микробной химиотерапии. Антибиотики и химиотер 1999; 44(12):5-14.
2. Labro M.T. Antibacterial agents – phagocytes: new concepts for old in immunomodulation. Int J Antimicrob Agent 1998; 10:11-21.
3. Mikasa K. Sawaki M., Kita E., et al. Significant survival benefit of clarithromycin threatment for patients with unrespectable lung cancer. Proceedings of the 4th International conference on the macrolides, azalides, streptogramins and ketolides. Barcelona, Spain; 1998. 40, 4.05.
4. Labro M.T. Experimental evaluation of antibiotics as immunomodulators. J Chemother 1994; 6 (Suppl.5):10-4.
5. Егоров А.М., Сазыкин Ю.О. Антимикробные агенты в будущем. Вклад геномики в их создание. Антибиотики и химиотер 1999; 44(12):5-14.
6. Moir D.T. , Shaw K.J., Hare R.S., Vovis G.F. Gemomics and antimicrobial drug discovery. Antimicrob Agent Chemother 1999; 43:439-46.
7. Heithott D.M., Conner C.P., Hanna P.C., et al. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by in vivo gene expression, PNAS USA 1997; 94:934-9.
8. Mahan M.T., Tobias T.W., Stauch T.M. Antibiotic – based selection of the bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. PNAS USA 1995; 92:669-73.
9. Cordwell S., Noawens A., Verrills N., et al. The microbial proteome database – an automated laboratory. Catalogue for monitoring protein expression in bacteria. Electrophoresis 1999; 20:3580-8.
10. Mann M. Quantitative proteomics? Nat Biotechnol 1999; 17:954-5.
11. Washburn M.P., Yates J.R. Analysis of the microbial proteome. Current Opinion Microbiol 2000; 3:292-7.
12. Lorenz M.G., Wackernagel W. Bacterial genes transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol Rev 1994; 61:627-32.
13. Davies J. Antibiotic resistance in mycobacteria In: Genetics and tuberculosis. John Wiley and Sons; 1998. p. 195-205.
14. Abraham E.P. Reflections on the development of the cephalosporins. Giorn Ital Chimioter 1970; 17:4-12.
15. Hamilton-Miller J.M.T. Sir Edward Abraham's contribution to the development of the cephalosporins: a reassessment. Int J Antimicrob Agent 2000; 15:179-84.