

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Давидович Н. В., Кукалевская Н. Н., Башилова Е. Н., Бажукова Т. А.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ЭВОЛЮЦИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БАКТЕРИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО Северный государственный медицинский университет Минздрава РФ, 163000, г. Архангельск, Россия

Проблема устойчивости микроорганизмов к антибиотикам имеет глобальное значение и представляет широкий интерес с молекулярно-генетической, экологической и клинической точек зрения. Обобщены современные представления об антибиотикорезистентности, деления микроорганизмов на чувствительные и устойчивые к действию антибиотиков, раскрыто понятие минимальной ингибирующей концентрации с современных позиций. Резистентность микроорганизмов к антибактериальным средствам может быть врожденной и приобретенной, являться одним из примеров эволюции, доступных к изучению. Современные методики полногеномного секвенирования и комплексные базы данных нуклеотидных последовательностей дают представление о многогранности механизмов природной устойчивости к антибиотикам и способны дать информацию о генах, кодирующих метаболические ферменты и белки, регулирующие основные процессы физиологии бактерий. Описаны пути распространения устойчивости микроорганизмов, отражены понятия «эффект основателя» (англ. founder effect) и биологическая цена сопротивления (англ. fitness cost) бактерий, лежащие в основе возникновения и эволюции антибиотикорезистентности. Происхождение генов устойчивости к антибиотикам, которыми в настоящее время обладают патогены человека, можно проследить с помощью изучения окружающих не только клинических, но и неклинических (экологических) мест обитания, ведь именно микроорганизмы окружающих экосистем являются донорами генов резистентности при горизонтальном их переносе.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность; эволюция; природная устойчивость; приобретенная резистентность; биологическая цена сопротивления; обзор.

Для цитирования: Давидович Н. В., Кукалевская Н. Н., Башилова Е. Н., Бажукова Т. А. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (6) 387-393.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-6-387-393>

Davidovich N.V., Kukalevskaya N.N., Bashilova E.N., Bazhukova T.A.

GENERAL PRINCIPLES OF ANTIBIOTIC RESISTANCE EVOLUTION IN BACTERIA (REVIEW OF LITERATURE)

FSBEI HE Northern State Medical University (Arkhangelsk) of the Ministry of Health of the Russian Federation, 163000, Arkhangelsk, Russia

Currently, the impact of antibiotic resistance on human health is a worldwide problem and its study is of great interest from a molecular genetic, environmental and clinical view-point. This review summarizes the latest data about antibiotic resistance, the classification of microorganisms as sensitive and resistant to the action of antibiotics, reveals the concept of minimum inhibitory concentration from modern positions. The resistance of microorganisms to antibacterial agents can be intrinsic and acquired, as well as being one of the examples of evolution that are currently available for study. Modern methods of whole-genome sequencing and complex databases of nucleotide-tagged libraries give an idea of the multifaceted nature of the mechanisms of intrinsic resistance to antibiotics and are able to provide information on genes encoding metabolic enzymes and proteins that regulate the basic processes of the physiology of bacteria. The article describes the main ways of spreading the resistance of microorganisms, reflects the concepts of "founder effect" and the fitness cost of bacteria, which underlie the emergence and evolution of antibiotic resistance. It is shown that the origin of antibiotic resistance genes that human pathogens currently possess can be traced by studying the surrounding not only clinical, but also non-clinical (ecological) habitats. As well as microorganisms of the surrounding ecosystems are the donors of resistance genes in horizontal gene transfer.

Key words: antibiotic resistance; evolution; intrinsic resistance; acquired resistance; fitness cost; review.

For citation: Davidovich N.V., Kukalevskaya N.N., Bashilova E.N., Bazhukova T.A. General principles of antibiotic resistance evolution in bacteria (review of literature). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (6): 387-393 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-6-387-393>

For correspondence: Kukalevskaya Natalya Nilolaevna, assistant of the Department of Clinical Biochemistry, Microbiology and Laboratory Diagnostics; e-mail: n.kukalevskaya@yandex.ru

Information about authors:

Davidovich N.V. <https://orcid.org/0000-0002-6414-9870>

Kukalevskaya N.N. <https://orcid.org/0000-0003-3371-1485>

Bashilova E.N. <https://orcid.org/0000-0002-9247-6633>

Bazhukova T.A. <https://orcid.org/0000-0002-7890-2341>

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 27.03.2020
Accepted 29.03.2020

Для корреспонденции: Кукалевская Наталья Николаевна, ассистент каф. клин. биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики; e-mail: n.kukalevskaya@yandex.ru

Введение. Антибиотики являются одними из самых успешных лекарств, используемых в борьбе с инфекцией, разработанных когда-либо. После их открытия стало очевидно, что некоторые бактерии способны развивать к ним резистентность. «Золотая эра» использования антибактериальных препаратов продлилась с 1930-х до 1960-х годов. В последнее время исследователи не смогли сохранить темп открытия новых антибиотиков ввиду постоянного возникновения резистентных патогенов (появление антибиотикорезистентных штаммов происходит примерно через 3-12 месяцев после введения антимикробного препарата в клиническую практику) [1].

Другими предпосылками глобального распространения антибиотикорезистентности послужили чрезмерное использование антибиотиков в сельском хозяйстве (для увеличения массы откармливаемых домашних животных, агрокультур, аквакультур) и клинической практике (безрецептурный отпуск лекарств, самолечение, назначение без показаний); неблагоприятная санитарно-эпидемиологическая ситуация в некоторых странах, включающая высвобождение неметаболизируемых антибиотиков в окружающую среду, совместно с увеличением международной мобильности населения [2].

Эти факторы могут оказывать влияние на здоровье человека с двух позиций: 1. прямое влияние на возможность эффективного лечения инфекции; 2. опосредованное влияние, например, при трансплантации, интубации, проведении хирургических процедур. В этих случаях использование антибиотиков для предотвращения или лечения сопутствующих инфекций может скомпрометировать терапию.

Ряд общественных организаций, включая Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ), Центры по контролю и предотвращению заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) крупнейших экономических держав, включая Российскую Федерацию, Всемирное экономическое сообщество рассматривают проблему антибиотикорезистентности в списке глобальной экологической катастрофы, что находит отражение в принятии стратегических документов по предупреждению и сдерживанию распространения антибиотикорезистентности. ВОЗ заявила, что появление и распространение антибиотикоустойчивых микроорганизмов в стационарах означает, что стандартные методы терапии теряют эффективность, инфекции не поддаются лечению и передаются окружающим. Новые механизмы устойчивости возникают и распространяются по планете, ставя под угрозу способность лечить распространённые инфекционные заболевания, удлиняя сроки выздоровления, вызывая инвалидность и смертность в популяции [3].

Можно наблюдать этап эволюции бактерий, в результате которой появляется всё больше микроорганизмов с полирезистентностью. В статье рассмотрены общие понятия относительно происхождения, распространения и эволюции антибиотикорезистентности среди бактериальных патогенов.

Что такое антибиотикорезистентность? В процессе эволюции микроорганизмы прошли фактор естественного отбора, включающий появление у них некоторых механизмов, позволяющих избежать летальных воздействий антимикробных веществ. Большинство антимикробных веществ продуцируется самими же микроорганизмами, такими как сапрофитные бактерии и грибы, другие антибиотики являются модифицирован-

ными полусинтетическими, третьи являются полностью синтетическими, такие как фторхинолоны и сульфаниламиды [4].

На пути эволюционного отбора микроорганизмы развивали защитные механизмы против антибиотиков, такие как модификация мишени действия антибиотика, ингибирование проникновения, активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс), формирование метаболических шунтов, выработка разрушающих противомикробные препараты ферментов. Функциональный метагеномный анализ почвенных микробов выявил большое разнообразие генетических детерминант, связанных с устойчивостью к антибиотикам, одной из которых являлась выработка ферментов (β -лактамаз). β -лактамазы являются примером естественной устойчивости подавляющего большинства клинически значимых микроорганизмов (за исключением микроорганизмов рода *Streptococcus*) к β -лактамам антибиотикам [5]. В последние два десятилетия количество инфекций, вызванных резистентными бактериями возросло именно из-за продукции β -лактамаз (например, ферментов β -лактамаз широкого спектра ESBLs, карбапенемаз, металло- β -лактамаз), что привело к появлению устойчивости к цефалоспорином III-IV поколения и карбапенемам [6].

Известен 21 ген, отвечающий за наличие антибиотикорезистентности, среди которых, например, для полирезистентных *Salmonella* и *E. coli* наиболее значимыми являются *AmpC*, *bla-TEM-1*, *bla-CTX-M-15*, *VIM-1*, *NDM-1*, *floR*, *tetG* и недавний *mcr-1* ген, кодирующий лекарственную устойчивость к колистину [7].

Описаны различные механизмы устойчивости, векторы и гены, отвечающие за передачу резистентности, идентифицируются и характеризуются учёными постоянно. Бактерии могут проявлять два механизма устойчивости: природную и приобретённую [8].

С клинической точки зрения, по уровню антимикробной активности, микроорганизм является чувствительным при высокой степени «терапевтического успеха» – ответа на проводимое лечение. Резистентный микроорганизм будет ассоциирован с низкой степенью «терапевтического успеха» [9]. Эти понятия учитывают фармакодинамику и фармакокинетику антибактериальных препаратов при установлении концентраций, требуемых для эрадикации микроорганизмов. Стоит отметить, что современные (с 01.01.2020 г.) критерии EUCAST представили пограничные значения для нескольких антимикробных препаратов, в соответствии с которыми микроорганизмы «дикого типа» (не имеющие фенотипически выявляемых приобретённых механизмов резистентности к препарату) оцениваются как «чувствительные при увеличенной экспозиции» вместо «чувствительные при стандартном режиме дозирования». Данная категоризация является клинически важной при решении вопроса о проводимой антибиотикотерапии, принимает во внимание низкий уровень устойчивости, который может быть первым шагом в приобретении клинически значимой устойчивости и лежит в основе изменчивости уровней МПК, наблюдаемых в настоящее время у некоторых бактерий [10].

Механизмы антибиотикорезистентности. Резистентность микроорганизмов может быть природной, характеризующейся отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика или недоступности мишени вследствие первично низкой проницаемости или

ферментативной инактивации и приобретённой, возникшей после проведения антибиотикотерапии. Развитие приобретённой резистентности объясняют два процесса: мутация [11] и горизонтальный перенос генов [12].

Мутации, которые приводят к невосприимчивости, случаются обычно в трёх типах генов:

- 1) кодирующих мишень антибиотика;
- 2) кодирующих транспорт антибиотика;
- 3) кодирующих регуляцию экспрессии переносчиков или разрушающих ферментов.

Хотя мутации в этих генах способствуют приобретению устойчивости к антибиотикам, сами по себе они не являются генами резистентности (хотя некоторые белки, такие как множественный белок устойчивости к антибиотикам MarA, описаны как таковые). Инактивация гена, кодирующего переносчик антибиотика или его мишени, делает это средство неэффективным, но это не позволяет квалифицировать этот ген как ген устойчивости.

Точно так же мутация в регуляторном гене, таком как *MarA*, может увеличить экспрессию генов эффлюксного насоса [13], но именно они сами по себе являются истинными генами устойчивости. Классификация этих элементов как генов резистентности может привести к некорректной оценке риска распространения антибиотикорезистентности, основанной на секвенировании опосредованном метагеномном анализе.

При горизонтальном переносе соответствующие гены должны перейти от комменсальных бактерий или бактерий окружающей среды, так как они отсутствовали до применения человеком антибиотиков. Существует доказательство того, что именно бактерии окружающей среды являются источником резистентных генов. Поскольку ряд антибиотиков синтезирован микроорганизмами окружающей среды, предполагается, что происхождение генов резистентности берёт начало от микроорганизма, синтезирующего этот антибиотик (в противном случае, при отсутствии у него генов устойчивости, продуцируемый антибиотик привел бы к гибели микроорганизма) [14]. Современные знания об антибиотикорезистентности указывают на то, что спектр микроорганизмов, несущих эти гены, значительно шире. Можно отследить происхождение всего некоторых генов устойчивости, которые приобретены человеческими патогенами. Одним из них является семейство *CTX-M* β -лактамаз, которое возникло у бактерий *Kluyvera*, в то же время как этот микроорганизм не является продуцентом антибиотиков [15].

Чтобы подавить рост бактерий, антибиотик должен сначала пройти сквозь клеточную стенку, причём некоторые из них нуждаются в активации, все антибактериальные препараты должны достигнуть своей мишени в достаточной для оказания эффекта концентрации. Эти этапы лежат в основе классического механизма резистентности. С биохимической точки зрения, они могут группироваться в механизмы, которые модифицируют мишень антибиотика или изменяют концентрацию его лиганда (самого антибиотика).

Модификация мишени может быть достигнута с помощью мутации (например, устойчивость к хинолону вызывается мутациями в топоизомеразах бактерий), замены мишени (устойчивость к β -лактамам часто связана с приобретением химерных пенициллин-связывающих белков (*англ.* penicillin-binding proteins PBPs)), ферментативной модификации мишени (например, устойчивость к ванкомицину развивается путём реорганизации

клеточной стенки) или защиты мишени (например, белок QngA защищает бактериальные топоизомеразы от активности хинолонов) [16].

Снижение концентрации антибиотиков может быть достигнуто путём препятствия их проникновению (например, отсутствие транспортера имипенема OpgD2 обеспечивает устойчивость к этому антибиотику у *Pseudomonas aeruginosa*), или откачиванием антибиотика через эффлюксные насосы. Эти механизмы не изменяют структуру самого антибиотика. Существуют механизмы, которые вызывают изменения в структуре антибиотика, например, мутации в ферменте, которые активируют пре-антибиотик (что необходимо для изоиазида при лечении *Mycobacterium tuberculosis*), или наличие антибиотик-инактивирующих ферментов [17].

Большинство мутаций, которые приводят к изменению чувствительности к антибиотикам, изученных в настоящее время, являются причиной небольших изменений МПК, что не особо принимается во внимание в клинической практике определения резистентности. Тот факт, что элементы, участвующие в основном метаболизме бактерий, вносят вклад в развитие устойчивости к антибиотикам, указывает на то, что эта устойчивость является не просто следствием действия нескольких конкретных элементов, но и физиологии бактерии в целом [18].

Природная устойчивость бактерий. Способность бактерии противостоять действию специфического антибиотика благодаря присущим структурным или функциональным свойствам известна как природная устойчивость. Примером может послужить природная устойчивость *Pseudomonas* к действию триклозана: отсутствие сайта-мишени для биоцида широкого спектра делает его неэффективным в отношении подавления роста данной бактерии. Предполагалось, что активный эффлюкс является причиной этой резистентности, впоследствии показано наличие *fabI* нечувствительного аллеля, кодирующего дополнительный фермент редуктазу белка-носителя эноилацила, являющегося сайтом-мишенью для триклозана [19].

Липопептид даптомицин, одобренный для клинической практики в 2003 г., является эффективным лекарственным средством против грамположительных бактерий, однако он неэффективен против грамотрицательных бактерий. Причиной этого являются врождённые различия в структуре цитоплазматической мембраны. Поскольку в цитоплазматической мембране грамотрицательных бактерий содержится меньшее количество анионных фосфолипидов по сравнению с грамположительными бактериями, эффективность введения Ca^{2+} -опосредованного даптомицина в цитоплазматическую мембрану, которая необходима для антибактериальной активности даптомицина, снижается [18].

Некоторые антибактериальные соединения не могут проникать через наружную мембрану, что рассматривается как вариант природной устойчивости. У грамположительных бактерий ванкомицин ингибирует сшивание пептидогликанов путём воздействия на пептиды d-Ala-d-Ala, тогда как у грамотрицательных бактерий ванкомицин не может проходить через наружную мембрану. С помощью геномных исследований *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* идентифицированы различные гены, связанные с природной устойчивостью к различным классам антибиотиков, таким как β -лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны. Для *E. coli* это *FabI*, *SapC*, *RecQ*,

TrxA (тиоредоксин), *TrxB* (тиоредоксинредуктаза), *DacA*, d-Ala-d-Ala карбоксипептидаза. Ингибирование этих генов может значительно повысить эффективность таких лекарственных препаратов, как триклозан, рифампицин, аминогликозиды и некоторых β -лактамов [20].

С клинической точки зрения, штаммы бактерий считаются природно-устойчивыми к антибиотикам, если МПК у всех штаммов выше определённого предела. Природная резистентность существовала и до применения антибиотиков, что связано с отсутствием мишени или снижением проницаемости для рассматриваемого антибиотика. Такая устойчивость требует эволюционных отношений между бактериями и антибиотиком. Ряд комплексных анализов, в основном *P. aeruginosa* и *E. coli*, показал, что чувствительность к антибиотикам является видовой особенностью, в появлении которой принимают участие несколько разных элементов. Последние исследования отражают, что любая мутировавшая бактерия (мутант), проявляющая пониженную чувствительность к данному антибиотику по сравнению с родительским штаммом, считается устойчивой независимо от того, какая установлена МПК. Когда мутант более чувствителен, чем его родительский штамм, считается, что инактивация белка, кодируемого мутантным геном, снижает степень природной устойчивости [21].

При исследовании природной резистентности бактерий использованы комплексные базы данных транспозонов, экспериментальная эволюция при отборе антибиотиков, методики полногеномного секвенирования. До 3% бактериального генома может отвечать за природную устойчивость. Механизмы резистентности к антибиотикам многогранны и не являются результатом активности лишь нескольких генов, появившихся в ответ на введение антибиотиков [22].

Экологический резистом. Одним из источников генов устойчивости к антибиотикам являются природные, неклинические экосистемы. Изучение механизмов резистентности среди патогенов человека требует знаний об эволюции и распространении устойчивости в данных неклинических экосистемах. Метагеномные и функциональные исследования показали, что гены устойчивости к антибиотикам встречаются повсеместно в любой анализируемой микробиоте [23]. Вариабельность элементов резистентности очень велика. Обязательно ли присутствие этих генов в данной экосистеме должно приравниваться к какому-либо конкретному риску распространения устойчивости к антибиотикам? Правила относительно определения генов устойчивости могут помочь в этом вопросе. Существуют две категории генов устойчивости:

- те, которые присутствуют в системах переноса генов и уже распространились среди патогенов человека;
- те, которые присутствуют только в хромосомах микроорганизмов окружающей среды.

Наличие первого типа в данной экосистеме считается риском распространения; однако наличие второго типа следует изучать с осторожностью перед тем, как сделать вывод. Например, наличие гена «домашнего хозяйства» (*англ. housekeeping gene*) *ampC* у *E. coli* в метагеноме кишечника следует считать маркером присутствия кишечной палочки, но не предиктором распространения устойчивости [24].

Поскольку происхождение генов резистентности, приобретённых патогенами человека путём горизонтального переноса, описано в некоторых случаях (см.

выше), то трудно предсказать шансы на появление нового гена устойчивости, присутствующего в данном метагеноме. Прийти к оценкам рисков, которые эти гены могут иметь для развития устойчивости, все ещё возможно. Идентификация инактивирующих ферментов, принадлежащих уже к известным категориям генов устойчивости, представляет ограниченный интерес для прогнозирования устойчивости в клинических условиях; в то время как обнаружение новых механизмов устойчивости к старым или новым лекарствам является первостепенной задачей [16].

При анализе процессов приобретения и распространения резистентности необходимо принимать во внимание эффект использования антибиотиков человеком, который, возможно, оказал влияние на эволюцию устойчивости к антибиотикам в природных экосистемах. Предполагается, что использование антибиотиков обогатило небольшое подмножество генов (те, которые в настоящее время присутствуют в элементах генов-переносчиков у патогенов человека) среди всех тех, которые могут обеспечить резистентность [24]. Освобождение этих генов из клинических условий или «ферм» в естественные экосистемы можно считать биологическим загрязнением. В отличие от других загрязняющих веществ, концентрации которых уменьшаются со временем и с удалением от точки загрязнения, элементы устойчивости к антибиотикам – автовосполняемые. Они встречаются почти везде, даже в нетронутых экосистемах, где антибиотики когда-либо встречались. Фермы и очистные сооружения следует рассматривать как среду высокого риска для отбора, поддержания и распространения устойчивости к антибиотикам, поскольку в таких местах могут появиться патогенные микроорганизмы в контакте с донорами генов устойчивости. Это может происходить в присутствии химических загрязнителей, таких как тяжёлые металлы или биоциды, которые способствуют селекции устойчивых к антибиотикам микроорганизмов [25].

Ненаследственная устойчивость к антибиотикам. Роль, которую физиология бактерий может играть в устойчивости к антибиотикам, становится более понятной при анализе ненаследуемой устойчивости к антибиотикам (фенотипической резистентности). Среди условий, которые вызывают фенотипическую резистентность, наиболее изученными являются формирование биоплёнок и персистенция бактерий. Находясь в биоплёнках, микроорганизмы показывают низкую чувствительность к различным антибиотикам. Фенотипическая устойчивость обычно является результатом изменённого метаболизма бактерий, который влияет на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам. Понимание этих изменений необходимо для разработки новых стратегий, направленных на повышение эффективности антибиотикотерапии. Это важно в отношении бактерий «антибиотико-персистеров», то есть бактерий, которые после контакта с антибактериальными средствами сохраняют жизнеспособность части популяции и возобновляют рост при прекращении контакта с антибиотиком [26]. Эти бактерии не являются антибиотико-резистентными мутантами: если происходит повторное введение антибиотика, бактериальная популяция погибнет полностью с той же скоростью, что и раньше. Бактерии-персистеры обладают метаболическим статусом, отличным от статуса основной части их популяции. Индукция метаболического сдвига может помочь в ликви-

дации таких клеток. Показано, что добавление определённых метаболитов после первоначального введения антибиотика способствует восстановлению бактериальной протонной движущей силы у бактерий-персистеров без возобновления роста, что делает их чувствительными к аминогликозидам [27].

Персистирующая *M. tuberculosis* погибает с той же скоростью, что и обычная при нарастании концентрации кислорода. Это свидетельствует о том, что антибиотики могут генерировать низкие концентрации активных форм кислорода (АФК). Клофазимид, увеличивающий концентрации АФК даже при низкой внутриклеточной концентрации кислорода, может успешно привести к эрадикации персистеров [28].

Лимитирующие факторы в приобретении и передаче антибиотикорезистентности. Количество различных генов устойчивости, приобретенных патогенами человека, низко по сравнению с большой вариабельностью генов резистентности, присутствующих в естественных экосистемах. Приобретённая устойчивость может испытывать эффект «бутылочного горлышка» (англ. bottlenecks) [29]. Первое из опасений – экологическая связь: ген устойчивости может быть передан только если есть контакт между реципиентом и донором (или его ДНК). Прямой контакт не является строго необходимым, так как достаточной может являться цепь передачи событий, связывающих реципиента и донора. Вряд ли такая цепочка передачи будет работать без положительной селекции для переносимого ген элемента, содержащего ген устойчивости. Происхождение гена *qnrA* у обитающих в воде бактерий и его расположение в плазмидах у других микроорганизмов окружающей среды предполагает, что прямая селекция событий переноса может происходить в местах обитания, загрязнённых антибиотиками, например, в рыбных фермах [30].

Второй эффект «бутылочного горлышка» является «эффектом основателя» (англ. founder effect) и заключается в следующем: в том случае, когда детерминанта устойчивости распространяется, маловероятно, что может быть приобретён другой схожий фенотип; селективное действие антибиотика в присутствии уже приобретённого гена устойчивости будет отсутствовать. Вероятно, это одна из основных причин скудной изменчивости (в сравнении с найденными в природных экосистемах) генов устойчивости, приобретённых патогенами человека.

Как только ген устойчивости приобретён, для его распространения и фиксации становятся необходимыми два условия. Во-первых, это принадлежность бактерии, несущей детерминант, к сообществу генного обмена – это повышает вероятность распространения гена. Ко второму относится биологическая цена сопротивления (англ. fitness cost) штаммов реципиента. Биологическая цена сопротивления специфична для каждого соответствующего гена [31].

Эффект «бутылочного горлышка» может влиять на возникновение и распространение мутаций, отвечающих за устойчивость к антибиотикам, основными из которых являются вероятность мутации и соответствующая биологическая цена сопротивления. Популяции бактерий обычно имеют субпопуляции с высокой частотой мутаций (гипермутаторы). Антибиотики могут временно (транзиторно) увеличивать уровень микробных мутаций. Увеличение частоты мутаций повышает вероятность того, что возникнет устойчивость. Ассоци-

рованная биологическая цена сопротивления является более важным лимитирующим фактором с точки зрения фиксации и распространения устойчивых к антибиотикам мутантов. Сопротивление необходимо не только для определения устойчивости к антибиотикам, но и для отбора определённых специфических мутантов. Очень низкие субингибирующие концентрации антибиотиков могут способствовать появлению антибиотико-резистентных мутантов как следствие в различии биологической цены сопротивления резистентных и чувствительных бактерий при их росте в концентрациях антибиотиков значительно ниже МПК [32].

При изучении биологической цены сопротивления важно отметить, что бактерии могут приобретать мутации, способные преодолеть эту силу. Определение способа появления этих вторичных мутаций и их эффекта на физиологию бактерий имеет важное значение для понимания эволюции антибиотикорезистентности.

«Две эпохи» эволюции антибиотикорезистентности. Тот факт, что гены устойчивости к антибиотикам, например, те, которые кодируют множественные антибактериальные эффлюксные насосы присутствуют в геномах всех изученных организмов, указывает на то, что они являются древними и развивались в течение миллионов лет, предшествующих началу терапевтического применения антибиотиков [33].

У антибиотикопродукторов гены устойчивости служат для защиты микроорганизма от антимикробного соединения, которые они производят, в то время как у микроорганизмов не способных к продуцированию антибиотиков, они эволюционировали, приобретая другие функциональные роли. Это может наблюдаться у хромосомнокодируемых β -лактамаз, для которых определена роль в переработке пептидогликана; или у антибактериальных эффлюксных насосов, которые могут участвовать в межклеточной передаче сигналов, связи растений с бактериями или защите бактерий от антимикробного иммунитета хозяина [34]. Данные элементы могут обеспечивать резистентность в присутствии антибиотиков, однако это не является их основной функциональной ролью.

Ограниченное подмножество хромосомно закодированных генов от бактерий окружающей среды получено с помощью элементов переноса генов, при этом их перенос в новый организм-хозяин происходил без влияния регуляторных и метаболических систем первичного хозяина [35]. Единственная функция этих генов у новых организмов-хозяев – устойчивость к антибиотикам. После того как гены приобретены, они могут далее трансформироваться под сильным антибиотико-селективным давлением. *TEM* [36] и *CTX-M* [37] гены β -лактамаз могут служить примером этого. Одно событие переноса, вероятно, является источником кодируемой плазмидой *TEM₁*, в то время как несколько событий переноса может обеспечить включение в плазмиды *CTX-M* [15]. Использование новых β -лактамов и ингибиторов β -лактамаз в клинических условиях является движущей силой дальнейшей дивергенции этих генных семейств.

Исследования микробов в естественной среде изменили представления об образе жизни и функциях бактерий (например, бактерии не растут изолированно, формируя отдельные колонии в живой природе). Несмотря на то, что способность выделять отдельные бактериальные колонии на агаре имела решающее значение для идентификации бактерий и изучения патогенности, этот

метод фактически задержал развитие микробной экологии. Акцент исследований делается на изучении взаимодействия внутри сложных бактериальных сообществ (микробиомов) в различных средах, так как многие заболевания возникают в результате полимикробных инфекций [38].

Заключение. Устойчивость к антибактериальным препаратам является глобальной экологической катастрофой и одним из немногих примеров эволюции, видимых в реальном времени, что делает её доступной для экспериментального изучения. Учитывая, что гены устойчивости к антибиотикам возникли в микроорганизмах окружающей среды, необходим тщательный анализ их клинических и неклинических (экологических) мест обитания для понимания и прогнозирования процессов эволюции и распространения антибиотикорезистентности. Одной из мер по сдерживанию распространения антибиотикорезистентности должно быть предотвращение сброса неметаболизированных антибиотиков в окружающую среду, их полное уничтожение перед утилизацией.

Наряду с рациональным использованием антибактериальных препаратов необходимо продолжать поиск новых противомикробных соединений и их бактериальных мишеней путём комплексных геномных исследований. Учитывая растущие знания об экологических резервуарах резистентности, особое внимание стоит уделять поиску генетических детерминант, связанных с устойчивостью к антибиотикам среди почвенных микробов. Одним из векторов в изучении эволюции антибиотикорезистентности должен стать анализ не изолированных бактериальных штаммов, бактериальных сообществ, формирующих биоплёнки, поскольку, находясь в биоплёнках микроорганизмы проявляют низкую чувствительность к различным антибиотикам за счёт механизмов фенотипической устойчивости.

Механизмы природной и приобретённой устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам многогранны и не являются результатом активности лишь нескольких генов, появившихся в ответ на введение антибиотиков. Мультифакториальное и многоуровневое изучение антибиотикорезистентности как важнейшего примера бактериальной эволюции позволит расширить представления о физиологии бактерий, их взаимодействии с организмом и не позволит нашим потомкам вернуться в доантибиотиковую эру [39,40].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 4-13, 15, 18-40 см. REFERENCES)

- Устойчивость к противомикробным препаратам [Электронный ресурс]. Сайт Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (дата обращения 27.08.2019).
- Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013; 58 (5-6): 38-48.
- Земляно О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам. *Экологическая генетика*. 2018; (3): 4-10.

- Дубилей С.А., Игнатов А.Н., Шемякин И.Г. Молекулярно-генетические методы идентификации лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2005; (1): 3-4.

REFERENCES

- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(18):5649–54.
- Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):417–33.
- Antimicrobial resistance [Electronic resource] // World Health Organization website (WHO) <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (accessed 27.08.2019).
- Holmes A.H., Moore L.S., Sundsfjord A., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016;387(10014):176–87.
- Andersson D.I., Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol*. 2014;12(7):465–78.
- Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol*. 2015;13(1):42–51.
- Voulgari E., Poulou A., Koumaki V., Tsakris A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? *Future Microbiol*. 2013;8(1):27–39.
- Lynch J.P. 3rd, Clark N.M., Zhanel G.G. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases). *Expert Opin. Pharmacother*. 2013;14(2):199–210.
- Morrissey I., Oggioni M.R., Knight D., Curiao T., Coque T., Kalkanci A., Martinez J.L. Evaluation of Epidemiological Cut-Off Values Indicates that Biocide Resistant Subpopulations Are Uncommon in Natural Isolates of Clinically-Relevant Microorganisms. (2014). *Public Library of Science ONE* 9(1): e86669.
- Logre E., Denamur E., Mammeri H. Contribution to Carbapenem Resistance and Fitness Cost of DcuS/DcuR, RcsC/RcsB, and YehU/YehT Two-Component Systems in CTX-M-15-Producing *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist*. 2019 Oct 9. doi: 10.1089/mdr.2019.0027.
- Martinez J.L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2014;1: 33-9.
- Boto L., Martinez J.L. Ecological and temporal constraints in the evolution of bacterial genomes. *Genes*. 2011;2:804–28.
- Hiltunen T., Virta M., Laine A.L. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2017 Jan 19;372(1712). pii: 20160039. Review. PubMed PMID: 27920384; PubMed Central PMCID: PMC5182435.
- Vinogradova K.A., Bulgakova V.G., Pauline A.N., Kozhevnikov P.A. The resistance of microorganisms to antibiotics: resistoma, its volume, diversity and development. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2013; 58 (5-6): 38-48. (in Russian)
- Canton R., Gonzalez-Alba J.M., Galan J.C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:110.
- Zemlyanko O.M., Rogozha T.M., Zhuravleva G.A. Mechanisms of multiple resistance of bacteria to antibiotics. *Ekologicheskaya genetika*. 2018 (3): 4-10. (in Russian)
- Dubiley S.A., Ignatov A.N., Shemyakin I.G. Molecular genetic methods for the identification of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2005 (1): 3-4. (in Russian)
- Randall C.P., Mariner K.R., Chopra I., O'Neill A.J. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other Gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013;57(1):637–9.
- Zhu L., Lin J., Ma J., Cronan J.E., Wang H. Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoylacyl carrier protein reductase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2010;54(2):689–98.
- Mwangi J., Hao X., Lai R., Zhang Z.Y. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zoological Research*. 2019. doi: 10.24272/zjr.issn.2095-8137.2019.062.

21. Olicares J., Bernardini A., Garcia-Leon G., Corona F., Sanchez M.B., Martinez J.L. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2013 Apr 30;4:103.
22. Hernando-Amado S., Sanz-Garcia F., Martinez J.L. Antibiotic Resistance Evolution Is Contingent on the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular biology and evolution*. 2019 Oct 1;36(10):2238-51. doi: 10.1093/molbev/msz144. PubMed PMID:31228244.
23. Karkman A., Do T.T., Walsh F., Virta M.P.J. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in microbiology*. 2018 Mar;26(3):220-8. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.005. Review. PubMed PMID: 29033338.
24. Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O., Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*. 2012;337(6098):1107-11.
25. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomedicine*. 2017;12:1227-49.
26. Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004;305(5690):1622-5.
27. Allison K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*. 2011;473(7346):216-20.
28. Grant S.S., Kaufmann B.B., Chand N.S., Haseley N., Hung D.T. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(30):12147-52.
29. Martinez J.L. Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2011;2:265.
30. Cabello F.C., Godfrey H.P., Tomova A., Ivanova L., Dolz H., Millanao A., Buschmann A.H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental microbiology*. 2013;15(7):1917-42.
31. Olivares J., Alvarez-Ortega C., Linares J.F., Rojo F., Kohler T., Martinez J.L. Overproduction of the multidrug efflux pump Mex-EF-OprN does not impair *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environmental microbiology*. 2012;14(8):1968-81.
32. Gullberg E., Cao S., Berg O.G., Ilback C., Sandegren L., Hughes D., Andersson D.I. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *Public Library of Sciences*. 2011;7(7):e1002158.
33. Martinez J.L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:1
34. Martinez J.L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings. Biological sciences*. 2009;276(1667):2521-30.
35. Martinez J.L., Sanchez M.B., Martinez-Solano L., Hernandez A., Garmendia L., Fajardo A. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *Federation of European Microbiological Societies*. 2009;33(2):430-49.
36. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant betalactamases. *New York Academy of Sciences* 2013;1277:84-90.
37. Novais A., Comas I., Canton R., Coque T.M., Moya A., Gonzalez-Candelas F., Baquero F., Galan J.C. Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *Public Library of Science*. 2010;6(1):e1000735.
38. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015. 56:20-51.
39. Baltz R.H. Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 33:507-13.
40. Projan S. J. Why is big pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr. Opin. Microbiol.* 2013. 6:427-30.

Поступила 27.03.20
Принята к печати 29.03.20