

УДК 577.155.2:615.1

ФАРМАКОЭНЗИМОЛОГИЯ И АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В ОБЛАСТИ АНТИБИОТИКОВ

А. М. Егоров

(Государственный научный центр по антибиотикам, Москва, Россия; тел.: 939-27-27)

Достижения последних десятилетий XX в. в области молекулярной энзимологии, молекулярной генетики и биоорганической химии, а также их реализация на практике привели к появлению новых тенденций в науке, среди которых можно назвать такое направление, как фармакоэнзимология. В статье обсуждаются ряд аспектов фармакоэнзимологии, связанных с изучением антибиотиков. Показано, что различные разделы фармакоэнзимологии взаимосвязаны и могут быть объединены в единую научную дисциплину. Особенно наглядно это продемонстрировано на примере антибиотиков – важнейшей группы лекарственных веществ, прямых продуктов ферментативного синтеза и ферментативной трансформации.

Успехи молекулярной биологии, молекулярной генетики и биоорганической химии в последние десятилетия XX в. и их практическая реализация привели к формированию ряда новых направлений исследований, в том числе таких, которые могут быть объединены под понятием «фармакоэнзимология». Полное секвенирование генома любого организма (от простейшего из прокариот – внутриклеточного патогена до высших эукариот), включая человека, позволяет в настоящее время иметь точное представление о наборе

ферментов в клетке любого биологического вида. способствуют международные базы данных со все более разнообразными компьютерными программами и быстрый процесс биоинформатики [1].

Исходя из количества структурных генов, кодирующих ферментные белки, число последних варьирует применительно к разным организмам от нескольких сотен до нескольких тысяч, а возможно и выше. Фармакопрепараты – как антимикробные и противоопухолевые агенты, так и

корректоры метаболизма нормальной ткани высшего организма реализуют свою биологическую активность, вступая во взаимодействие с ферментами нередко уже на стадии проникновения в клетку.

Нередко перед взаимодействием с конечной внутриклеточной мишенью проникший в клетку фармакопрепарат должен подвергнуться ферментативной активации. Это явление хорошо изучено на примере антимикробных агентов (изониазид, пиразинамид), противоопухолевых антибиотиков (митомицины) и т.д. [2].

Наиболее обширный раздел фармакоэнзимологии включает изучение молекулярных механизмов реагирования лекарственных средств с существенными для жизнеспособности клетки мишенями. В большинстве случаев реагирование связано со взаимодействием с активным центром фермента, реже – с аллостерическим. Результаты подобных исследований создают фундаментальные основы для разработки новых высокоэффективных фармакопрепаратов.

В сферу интересов фармакоэнзимологии попадает и комплекс проблем, связанных с быстрым распространением лекарственной резистентности и ее различными механизмами, в которых в большинстве случаев участвуют непосредственно ферменты. На основе знания механизмов распространившейся резистентности микроорганизмов к применяемым в течение многих лет антимикробным препаратам ведется целенаправленная трансформация старых структур с целью создания их производных, эффективных против микроорганизмов, устойчивых к прототипу. Трансформация – получение новых поколений лекарств – ведется не только химическими, но и ферментативными методами, а в большинстве случаев сочетанием тех и других методов. Область фармакоэнзимологии, таким образом, расширяется.

Наконец, необходимо отметить следующее. Сборка углеродного скелета молекул антибиотиков как вторичных метаболитов, включение в молекулу необычных для природных соединений структурных фрагментов, часто в необычной стереоформе и т.п. непосредственно отражают основную функцию антибиотиков – избирательность их биологического действия, т.е. избирательное реагирование определенного антибиотика с конкретной внутриклеточной мишенью [3]. В связи с этим специальные ферменты, катализирующие конечные стадии биогенеза, ответственные за «дизайн» молекулы антибиотика, также составляют предмет изучения фармакоэнзимологии.

Ниже мы рассматриваем некоторые из аспектов фармакоэнзимологии в приложении к антибиотикам в более подробной форме.

Первое место по значимости в инфекционной клинике, несомненно, занимают бета-лактамы – ингибиторы транспептидаз пептидогликана. Не касаясь огромной литературы, посвященной механизму действия бета-лактамов, отметим лишь одну важную в практическом плане проблему, связанную с недостаточной изученностью транспептидазы 2a или 2', которая появляется в клетке у метициллинорезистентных стафилококков (MRSA) или стрептококков, заменяет, по-видимому, функции всех остальных транспептидаз и при всем этом не чувствительна к бета-лактамам. Поиск ее ингибиторов относится к числу наиболее актуальных современных проблем в области антимикробной химиотерапии.

Быстро развивается в настоящее время направление исследований, связанное с созданием и внедрением в клинику все новых ингибиторов – ДНК-топоизомераз [4]. Этому способствует бурный прогресс знаний в самой этой области энзимологии. Следует отметить, что наиболее изученный представитель ДНК-топоизомераз, ДНК-гираза, является мишенью для разных антимикробных структур (природная – новобиоцин, реагирующая с субъединицей В, и синтетические – фторхинолоны, реагирующие одновременно с субъединицей А и контактирующие с ней участком субстрата фермента, т.е. ДНК).

Что касается антифунгальных препаратов из числа доказавших свою ценность в клинике, то здесь своего рода резервуаром мишеней оказались ферменты системы биосинтеза эргостерола – специфического для грибов компонента цитоплазматической мембраны. На них воздействуют представители рядов азолов и аллиламинов, количество которых быстро возрастает [5, 6].

Лишь для двух групп применяемых в клинике антибиотиков убедительно доказано, что их непосредственными мишенями являются низкомолекулярные вещества клетки: предшественники пептидогликана в случае антибиотиков – гликопептидов (ванкомицина, тейкопланина) и эргостерол в случае полиенов (нистатина и амфотерицина В).

Сопоставление числа ферментов, реализованных как мишени в антимикробной химиотерапии, с числом ферментов в бактериальной и грибной клетке, становящимся точно известным для каждого вида (исходя из данных геномики и биоинформатики), позволяет сделать вывод о том, что подавляющее количество микробных ферментов еще не востребовано в качестве мишени для лекарственных препаратов.

Кроме того, известно, что число выделенных как индивидуальными природными структурами антибиотиков, не вошедших по тем или иным причинам в медицинскую практику, составляет около двадцати тысяч. Среди них описаны ингибиторы ферментов, включенных в дорибосомные стадии белкового синтеза, ферментов, входящих в системы процессинга, ферментов, катализирующих реакции сборки липопротеидов и липополисахаридов внешней мембраны грамотрицательных бактерий, ферментов, включенных в энергодающие реакции, и т.п. В настоящее время необходимо провести пересмотр всех ингибиторов природного происхождения, многие из которых имеют ценность как корректоры метаболизма тканей высших организмов при обменных заболеваниях. Целесообразно провести испытание их воздействия на ферменты, действующие в таких (недавно открытых) явлениях, как сигнальная трансдукция, апоптоз и др.

Как уже отмечалось, одной из важнейших задач фармакоэнзимологии является разработка путей борьбы с антибиотикорезистентностью. Прямая ферментативная инактивация бета-лактамов – гидролитическое расщепление бета-лактаманного кольца – осуществляется примерно ста изоформами β -лактамаз с разной субстратной специфичностью. Классификация β -лактамаз все более усложняется. Внеклеточные β -лактамазы грамположительных микроорганизмов по каталитической активности занимают, что следует подчеркнуть, первое место среди всех известных групп ферментов. Амигликозидные антибиотики (стрепто-

мицин и др.) инактивируются фосфо-, аденилил- и ацетилтрансферазами. Эритромицин и другие макролиды являются субстратами их фосфорилирующих, гликозилирующих ферментов, а также расщепляющих их макроциклическое кольцо эстераз. Инактивирующие ферменты известны для хлорамфеникола.

Резистентность, возникшая на уровне мишени, если жизненно важной мишенью является сам фермент (например, РНК-полимераза), объясняется участием фермента, меняющего свою конформацию и сродство к антибиотику. Частая резистентность к ингибиторам белкового синтеза на уровне столь сложных надмолекулярных структур, как рибосомы, допускает два объяснения: изменение первичной структуры входящих в них индивидуальных белковых компонентов (т.е. хромосомная мутация) или появление в клетке фермента, чаще плазмидного происхождения, модифицирующего тот или иной компонент рибосомы на одной из стадий ее сборки.

Давно известны многочисленные мутации, обуславливающие резистентность бактерий к стрептомицину и/или другим аминогликозидам за счет изменения первичной структуры и соответственно конформации тех или иных белков малой рибосомной субъединицы. Известна также обуславливающая резистентный фенотип N-метилаза, катализирующая метилирование двух остатков аденина – 2058 и 2059 в 23S РНК большой рибосомной субъединицы. Это ведет к широко распространенному механизму резистентности к эритромицину и другим макролидным антибиотикам, теряющим способность реагировать с пептидилтрансферазным центром бактериальной рибосомы. Данный случай является примером прямого участия фермента в резистентности к антибиотикам бактерий и на рибосомном уровне [7, 8].

Большое внимание клиницистов привлекает, наконец, необычное явление, получившее название толерантности бактерий, которое не может рассматриваться в отрыве от антибиотикорезистентности и должно изучаться именно с энзимологических позиций. При толерантных штаммах размножение клеток, обработанных такими бактерицидными антибиотиками, как беталактамы, подавляется при низких концентрациях последних, однако бактерицидного эффекта не наступает. Характерная особенность толерантных штаммов – медленная скорость размножения (вяло текущие инфекции, например эндокардиты) и способность к перенесению высоких концентраций беталактамов. Это объясняется своеобразным ферментным «профилем» клетки – дефицитом пептидогликан-гидролаз. Физиологические функции этих ферментов при росте и делении клеток заключаются в расщеплении как продольных полисахаридных нитей в пептидогликане, так и коротких поперечных пептидных мостиков между ними, что необходимо для вставки в разрезы новых участков при увеличении объема клетки и ее делении. В жизненном цикле клетки существует равновесие между ферментами, гидролизующими пептидогликан, и ферментами его синтеза. Если синтез (не гидролиз) подавлен беталактамом, гидролазы становятся автолитическими ферментами, включенными в бактерицидный эффект антибиотика.

В связи с этим интересно отметить, что многочисленные ранние попытки обнаружить синергизм при совместном действии пенициллина и лизоцима не привели к успеху потому, что были выбраны неудачные тест-объекты. Экспери-

менты следовало проводить на толерантных штаммах с дефицитом пептидогликан гидролаз.

Самостоятельной, хотя и не получившей еще широкого развития областью фармакоэнзимологии является разработка «prodrugs» – конъюгатов разных антибиотических структур, между которыми создается ковалентная связь (например, эфирная между цефалоспорином и фторхинолоном). Внутриклеточными ферментами такие связи расщепляются, и каждый компонент расщепленного конъюгата реагирует со своей мишенью. При этом, по некоторым данным, компоненты конъюгата могут накапливаться в клетке в большем количестве, чем при контакте с клеткой их эквимольных смесей. Описан также конъюгат гликопептидного антибиотика ристомицина с циклопептидом полимиксином. Лучшей всасываемостью по сравнению с ампициллином обладают его эфиры (пивампициллин, бакампициллин), превращающиеся в ампициллин после всасывания в животной клетке.

К фармакоэнзимологии должна быть отнесена также технология использования иммобилизованных ферментов (промышленных биокатализаторов) при получении из бензилпенициллина и цефалоспорино С новых поколений полусинтетических беталактамов.

В заключение следует кратко остановиться на принципиальных особенностях биосинтеза антибиотиков на примере некоторых их важнейших структур.

Известно, что биосинтез, иными словами, ферментативный синтез антибиотиков определяется следующими положениями:

- 1) антибиотики не относятся к прямым продуктам трансляции;
- 2) антибиотики являются вторичными веществами, т.е. образуются из первичных метаболитов;
- 3) «сборка» молекулы любого антибиотика происходит с участием от нескольких единиц до нескольких десятков ферментов;
- 4) субстратная специфичность, по крайней мере, большинства этих ферментов такова, что ограничивает их участие в первичном метаболизме;
- 5) упорядоченность «сборки» молекулы антибиотика, т.е. координация действия ферментов и соблюдение четкой последовательности ферментативных реакций, обеспечивается формированием (в большинстве случаев за счет водородных связей) мультиферментных комплексов с фиксированным взаиморасположением включенных в них ферментов. Наиболее подробно это прослежено применительно к антибиотикам – циклопептидам;

6) защита клетки продуцента от собственного антибиотика (если она содержит к нему мишень) может осуществляться разными путями, в том числе путем временной ферментативной инактивации антибиотика внутри клетки с реактивацией при его освобождении в среду. Например, фосфорилирование и соответственно дефосфорилирование были продемонстрированы при работе с продуцентами некоторых аминогликозидных антибиотиков. Защита, однако, может быть обусловлена и другими механизмами и путями, например расположением мультиферментных комплексов на периферии клетки, наличием системы выброса антибиотика через оболочку в среду и слабой проницаемостью оболочки к обратному его проникновению в клетку.

В целом кластеры генов сборки антибиотической молекулы в геноме продуцента, как правило, сцеплены с генами, кодирующими и механизм защиты от образуемого продуцентом антибиотика. Здесь же следует отметить, что существует много доказательств переноса генов защитных ферментов из клеток продуцентов – почвенных грибов и актиномицетов в клетки патогенных и условно патогенных бактерий.

Что касается ферментативного синтеза важнейшей по значению β-лактамной антибиотической структуры, то ее исходными первичными метаболитами являются три аминокислоты, естественно, в L-стереоформе. Реакции вторичного метаболизма начинаются в данном случае с формирования L-аминоадипил-L-цистеина – начального предшественника беталактамной структуры. Затем к дипептиду присоединяется валин, причем последний превращается из L- в D-форму. Таким образом, в формировании LLD-трипептида – начальной стадии сборки беталактамной структуры, участвуют как минимум три фермента. Далее происходит катализируемое соответствующими ферментами образование моноциклического беталактама, т.е. замыкание четырехчленного беталактамного кольца и после этого (в случае пенициллинов) пятичленного, серосодержащего, сконденсированного с беталактамным. Эта структура получила название изопенициллина N. Затем удаляется остаток аминокислотной кислоты и в реакцию с аминогруппой беталактамного «ядра» вступает (с участием КоА, т.е. в активированной форме) фенилуксусная. Изопенициллин N превращается в бензилпенициллин.

Общий для пенициллинов и цефалоспоринов участок пути их биосинтеза заканчивается на стадии изопенициллина N. В случае цефалоспорина C (природный цефалоспорин – прототип четырех поколений полусинтетических цефалоспоринов, применяемых в практике) происходит так называемая экспансия – расширение серосодержащего кольца в шестичленное, где каталитическую роль играет фермент с тривиальным названием «экспандаза». Расширение кольца сопряжено с превращениями при C-3.

Все изложенное не только демонстрирует разнообразие ферментов, включенных в биогенез пенициллинов и цефалоспоринов, но и подчеркивает сложность генетических манипуляций при повышении активности их продуцентов, так как при этом необходимо контролировать работу мно-

гих структурных генов, исходя из классического тезиса: один ген – один фермент.

Исходным первичным метаболитом для углеродного скелета антибиотиков, принадлежащих к другой известной группе вторичных природных структур – аминогликозидам, является глюкоза. Можно отметить, в частности, около десяти ферментативных реакций, обуславливающих превращение глюкозы через D-миоинозат в так называемый «консервативный» фрагмент структуры аминогликозидов – шестичленный углеродный цикл с гуанидиновыми или аминогруппами при C-1 и C-3. Вариации сахаров в семействах аминогликозидных антибиотиков (канамицины, гентамицины, неомицины и др.) обширны, циклитольный фрагмент фактически постоянен – это 2-дезоксистрептамин. Была сделана попытка сочетать одновременно методы генетики, энзимологии и органического синтеза для создания новых аминогликозидных антибиотиков с измененным или вообще замененным аминокислотным фрагментом. Были получены «блок-мутанты», лишенные генов, кодирующих ферменты биосинтеза именно циклитольного фрагмента, но сохранившие остальные ферменты биосинтеза аминогликозидной молекулы. В результате появилась возможность включать в «недособранную» молекулу аминогликозидного антибиотика имитирующие циклитол фрагменты, получаемые путем органического синтеза. Ограничивающим фактором здесь являются, конечно, пределы субстратной специфичности ферментов, катализирующих присоединение циклитола к сахарам в аминогликозидном антибиотике – иными словами, катализирующих образование одной или двух гликозидных связей с новым агликоном («мутасинтоном») и одним или двумя сахарами в соответствии с прототипом модифицируемого аминогликозидного антибиотика. Такие «мутасинтетические» антибиотики были получены, хотя о практически ценных структурах пока еще не сообщается.

Различные разделы фармакоэнзимологии объединены, как следует из данного сообщения, внутренними связями, формирующими единую научную дисциплину. Особенно наглядно это демонстрируется на примере антибиотиков (важнейшей группы лекарственных веществ) – прямых продуктах ферментативного синтеза и ферментативной трансформации, ингибиторах существенных для жизнедеятельности ферментов и субстратах защитных ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moir D.T., Shaw K.J., Hare R.S., Vovis G.F. // *Antim. Agents Chemother.* 1999. **43**. P. 439.
2. Davies J. // *Genetics and tuberculosis*. N.Y., 1998. P. 195.
3. Сазыкин Ю.О. / Биотехнология лекарственных средств. М., 1991. С. 149.
4. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты фторхинолонов в клинической практике. М., 1998. P. 351.
5. Bosshe H.V., Marichal P. *Recent Progress in Antifungal Chemotherapy*. N.Y., Basel, Hong Kong, 1990. P. 25.
6. Ruder N.S. Mechanism of action of allylamine antifungal drugs // *Ibid.* P. 41.
7. Collette P., Donthwaitte S., Mankin A., Mauvas P. Similarities and differences in ketolide and macrolide interaction within two distant domains of 23S ribosomal RNA. 4th Intern. Conf. Macrolides, Azalides, Streptogramins and Ketolides: Abstr. 1998, 21–23 January, 1.23.
8. Gold H.S., Moellering R.C. // *N. Engl. J. Med.* 1996. **335**. P. 1445.
9. Степная О.А., Ледова Л.А., Кулаев И.С. // *Усп. биол. хим.* 1999. **39**. P. 327.

Поступила в редакцию 20.06.00