



НАУКА

— 1727 —

Российская академия наук

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Том 58 № 6 2024 Ноябрь–Декабрь

Основан в 1967 году В.А. Энгельгардтом

Выходит 6 раз в год

ISSN: 0026-8984

Журнал издается под руководством

Отделения биологических наук РАН

Главный редактор

А.А. Макаров

Редакционная коллегия

А.В. Баранова, В.А. Гвоздев, М.С. Гельфанд, С.Г. Георгиева,

М.Б. Готтих, В.Г. Дебабов, О.А. Донцова,

В.Л. Карпов (*заместитель главного редактора*), С.Н. Кочетков,

Д.В. Купраш, О.И. Лаврик, Д.А. Лось, С.А. Лукьянов, В.А. Митькевич,

А.В. Морозов (*заместитель главного редактора*),

С.А. Недоспасов, В.С. Прасолов, Т.А. Пронина (*ответственный секретарь*),

О.О. Фаворова, А.В. Финкельштейн, П.М. Чумаков

Международный редакционный совет

Егор Васецкий (Москва, Вильжюиф), Андрей Гудков (Баффало),

Григорий Ениколопов (Колд Спринг Харбор), Юлия Кжышковска (Маннгейм),

Алексей Кондрашов (Москва), Евгений Кунин (Бетесда),

Инна Лаврик (Новосибирск, Магдебург), Руслан Меджитов (Нью Хейвен),

Сергей Миркин (Медфорд), Евгений Нудлер (Нью Йорк),

Евгений Рогаев (Москва, Вустер), Александр Руденский (Нью Йорк),

Василий Студитский (Москва, Филадельфия), Михаил Шерман (Ариэль),

Марат Юсупов (Казань, Страсбург)

Редакция

Заведующая редакцией И.А. Усанова

Редакторы. Е.Ю. Дмитриева, Л.В. Мочалова

Выпускающий редактор Е.Ю. Дмитриева

Журнал включен в библиографические базы данных

Chemical Abstracts (CAS), Index Medicus (Medline), Biological and Agriculture Index,

CAB Abstracts, SCOPUS, Microbiology Abstracts Section B: Health and Safety Science,

Virology and AIDS Abstracts

Телефон редакции: (499) 343-78-07; E-mail: jrmolbio@gmail.com

Web site: <http://www.molecbio.ru>

Москва

ФГБУ «Издательство «Наука»

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 6, 2024

ОБЗОРЫ

Устойчивость к антибиотикам: угрозы и поиски выхода <i>С. Н. Кочетков</i>	851
История создания нового поколения антибиотиков группы полициклических гликопептидов <i>Е. Н. Олсуфьева</i>	862
Секреты выживания <i>Neisseria gonorrhoeae</i> : генетическая изменчивость, патогенез и лекарственная устойчивость <i>Б. Л. Шаскольский, И. Д. Кандинов, Д. А. Грядунов, Д. В. Кравцов</i>	887
Ферменты биосинтеза ADP-гептозы как мишени для создания антибактериальных препаратов широкого спектра действия <i>Т. А. Серегина, И. Ю. Петрушанко, К. В. Лобанов, Р. С. Шакулов, А. С. Миронов</i>	927
Распространение генов антибиотикорезистентности в микробных сообществах: влияние антропогенного загрязнения <i>И. С. Сазыкин, М. А. Сазыкина, А. Р. Лицевич</i>	937

ПОЛУЧЕНИЕ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

Исследование токсичности фармакологической пары инкапсулированная <i>Citrobacter freundii</i> С115Н метионин- γ -лиаза / метиин <i>С. В. Ревтович, В. В. Куликова, В. С. Коваль, А. Д. Лыфенко, В. А. Казаков, А. С. Чернов, Г. Б. Телегин, А. С. Земская, Н. В. Ануфриева, Е. А. Морозова, П. Н. Сольев</i>	953
Синтез и противомикробная активность тиосульфидов – аналогов аллицина <i>В. М. Пучков, А. Д. Лыфенко, В. С. Коваль, С. В. Ревтович, В. В. Куликова, Н. В. Ануфриева, А. С. Земская, Е. А. Морозова, П. Н. Сольев</i>	966
Разработка нового ингибитора бактериальной цистатионин- γ -лиазы на основе 6-броминдола и аминотиофена <i>Р. А. Новиков, Д. Н. Платонов, А. Ю. Белый, К. В. Потапов, М. А. Новиков, Ю. В. Томилов, О. И. Кечко, Т. А. Серегина, П. Н. Сольев, В. А. Митькевич</i>	975

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

Идентификация клинического изолята ССГС 19/16 как <i>Vacillus cytotoxicus</i> <i>Н. Б. Поляков, Д. С. Карпов, М. В. Зубашева, А. Н. Полякова, Д. Н. Щербинин, А. И. Соловьев, М. В. Лаврентьев, Т. А. Смирнова, М. А. Сухина, В. Г. Жуховицкий</i>	983
Гены устойчивости к антибиотикам в микробиоте кишечника крупного рогатого скота: влияние условий содержания <i>Ш. А. Бегматов, А. В. Белецкий, А. Л. Ракитин, А. П. Лукина, Л. О. Соколянская, А. В. Ракитин, Л. Б. Глухова, А. В. Марданов, О. В. Карначук, Н. В. Равин</i>	996
Анализ частоты встречаемости продуцентов β -лактамаз среди энтеробактерий, выделенных у пациентов хирургического и терапевтического профиля <i>С. Ю. Мещурова, А. Г. Коробова, Л. М. Самоходская</i>	1007
СrG-светофоры участвуют в активном деметилировании ДНК <i>А. В. Лиознова, Ю. А. Медведева</i>	1020

МЕТОДЫ

- Применение гигантского комбинационного рассеяния для повышения чувствительности МТТ-теста
В. А. Мушенков, Д. А. Лукьянов, Н. Ф. Мещерякова, В. И. Кукушкин, Е. Г. Завьялова 1031
- Адаптация метода получения трансгенных мышей на основе *in utero* электропорации
Ю. В. Попова, В. Д. Бец, Е. С. Омелина, Л. В. Болдырева, Е. Н. Кожевникова 1041
-

СТАРЕНИЕ И ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

- Антигликирующая активность производных изоиндола и ее предсказание с использованием энергий граничных молекулярных орбиталей
У. М. Ибрагимова, Н. В. Валуйский, С. А. Сорокина, К. И. Жукова, В. Р. Райберг, Р. А. Литвинов 1052
- Новые эпигенетические маркеры возрастзависимых изменений сердечно-сосудистой системы
Л. М. Ермакова, Е. А. Давыдова, Е. В. Кондакова, К. В. Кучин, М. В. Ведунова 1061
-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

- Профили экспрессии генов семейства *TRIM* в нейрональных и глиальных культурах здоровых доноров и пациентов с болезнью Паркинсона в норме и при нейровоспалении
В. В. Ненашева, Е. В. Новосадова, Т. П. Герасимова, Л. В. Новосадова, А. Ю. Коток, Е. Л. Арсеньева, Е. А. Степаненко, И. А. Гривенников, В. З. Тарантул 1075

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ: УГРОЗЫ И ПОИСКИ ВЫХОДА

© 2024 г. С. Н. Кочетков^{а, *}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: snk1952@gmail.com

Поступила в редакцию 20.05.2024 г.

После доработки 05.06.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и, в более широком смысле, к противомикробным препаратам — естественное биологическое явление, создающее серьезные проблемы здравоохранению. Первые случаи массового появления устойчивых штаммов бактерий были отмечены в середине 20 века; с тех пор резистентность регистрируется во всем мире, а в последние два десятилетия все чаще выявляют множественную лекарственную устойчивость. Развитию резистентности способствует злоупотребление антибактериальными средствами, а также выбросы таких средств в окружающую среду. К сожалению, поиск и разработка новых эффективных антибиотиков сокращается, тогда как требуется усиление этой работы, а также поиск альтернативных методов терапии инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: антибиотики, противомикробные препараты, инфекционные заболевания, резистентность

DOI: 10.31857/S0026898424060012, **EDN:** HNDNRK

ВВЕДЕНИЕ

Резистентность (устойчивость) микроорганизмов к антимикробным препаратам (AntiMicrobial Resistance) вносит значительный вклад в рост заболеваемости и смертности во всем мире и представляет одну из серьезнейших проблем здравоохранения. По данным ВОЗ, в 2019 г. с устойчивостью бактерий к антимикробным препаратам связаны 4.95 млн смертей по всему миру, а в 1.27 млн случаев такая устойчивость стала непосредственной причиной смерти [1]. Это значительно превышает число смертей от таких инфекций, как ВИЧ/СПИД и малярия, которые в 2019 г. унесли жизни 860000 и 640000 человек соответственно. Медицинские, экономические и социальные последствия устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам, включая рост смертности и финансового бремени, трудно переоценить. Предполагается, что к 2050 году резистентные микроорганизмы будут уносить 10 млн жизней в год — больше, чем онкологические заболевания (<https://www.statista.com/chart/3095/drug-resistant-infections/>). Очевидно, что при разработке новых стратегий лечения инфекционных заболеваний необходимо детально понимать молекулярные механизмы, лежащие в основе резистентности возбудителей к антимикробным препаратам, равно как

и создавать новые эффективные антимикробные препараты.

Антимикробные препараты играют важную роль в здравоохранении, животноводстве и агрономии. В течение многих десятилетий они успешно использовались для лечения или предотвращения широкого спектра инфекционных заболеваний. Принято считать, что эра антимикробных препаратов началась в 1910 г., когда Пауль Эрлих создал синтетические препараты сальварсан и неосальварсан и применил их для лечения сифилиса. При этом врачи в Греции, Египте и Китае многие столетия назад использовали микроорганизмы, вырабатывающие антибиотики, при инфекционных заболеваниях. Так, следы тетрациклина обнаружены в костях египетских мумий, датированных 1550 г. до н.э. (<https://www.news-medical.net/health/The-History-of-Antibiotics.aspx>).

Представляется необходимым дать определение антимикробных препаратов и показать различие между антимикробными препаратами и антибиотиками, поскольку зачастую эти понятия неправильно считают синонимами. Представленные в табл. 1 данные, по нашему мнению, вносят ясность в этот вопрос.

Таблица 1. Сравнение понятий “антимикробные препараты” и “антибиотики”

Антимикробные препараты	Антибиотики
Синтетические или природные химические соединения, способные разрушать различные виды микроорганизмов	Химические соединения, продуцируемые микроорганизмами и способные ингибировать рост (бактериостатики) или разрушать (бактерициды) бактерии
Эффективны в отношении бактерий, вирусов, грибов, паразитов, простейших	Эффективны в отношении бактерий
Не все антимикробные агенты являются антибиотиками	Все антибиотики являются антимикробными агентами
Первый антимикробный агент – сальварсан (соединение 606)	Первый антибиотик – пенициллин

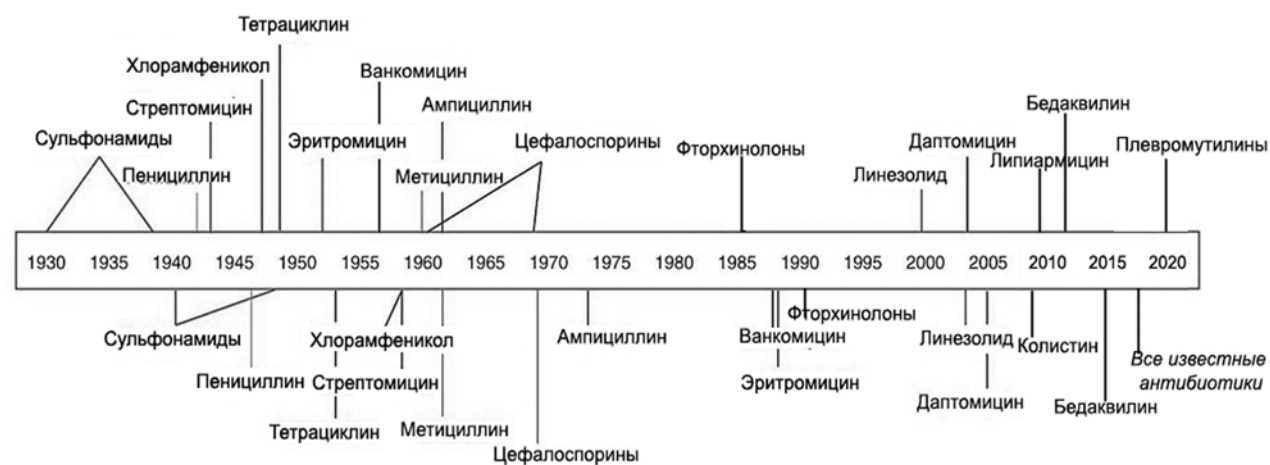
Открытие в 1928 г. Александром Флемингом пенициллина – первого коммерчески доступного природного антибиотика, и его введение в практику в 1940-е годы ознаменовало начало “золотого века” антибиотиков, совершивших мировую революцию в лечении бактериальных инфекций. Однако уже в 1942 г. появились сообщения об устойчивости к пенициллину золотистого стафилококка, а затем и у других микробов (Centers for Disease Control and Prevention (2020) About antibiotic resistance. <https://www.cdc.gov/drug/resistance/about.html>).

С этого времени началось “соревнование” между вновь создаваемыми антибиотиками и появлением соответствующих резистентных штаммов микроорганизмов (рис. 1). Следует отметить, что с середины 80-х годов прошлого столетия темпы появления новых антибиотиков постоянно замедлялись главным образом вследствие того, что инвестиции в фармацевтику в основном направлялись на создание других препаратов либо намного более дорогих

(например, противоопухолевых), либо назначаемых пожизненно (например, антигипертензивных, антихолестериновых). Однако вероятность катастрофического возврата ко всем ужасам “доантибиотической” эры вынудила национальные и международные организации, включая ВОЗ, рассматривать проблему резистентности к антибиотикам среди главных рисков здоровью населения.

Новые антибиотики становятся клинически все менее эффективными, поскольку микроорганизмы приобретают устойчивость к ним все быстрее и быстрее. В результате появляются штаммы бактерий, устойчивые практически ко всем антимикробным препаратам. В конце февраля 2017 г. ВОЗ опубликовала список из 12 наиболее антибиотикоустойчивых “приоритетных патогенов” (superbugs), разделенных по уровню потребности в создании новых антибиотиков, эффективных против них, на три группы: крайне приоритетные, высокоприоритетные и среднеприоритетные. Этот список должен

Введение антибиотика в практику



Появление устойчивых штаммов

Рис. 1. Введение в практику новых антибиотиков и появление резистентных к ним штаммов.

Таблица 2. Особо устойчивые бактерии – приоритеты ВОЗ по потребности в создании новых антибиотиков*

Уровень приоритетности	Патоген
Критический	<i>Acinetobacter baumannii</i> , устойчивость к карбапенемам <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , устойчивость к карбапенемам <i>Enterobacteriaceae</i> , устойчивость к карбапенемам и продукция бета-лактамазы расширенного спектра действия (ESBL)
Высокий	<i>Enterococcus faecium</i> , устойчивость к ванкомицину <i>Staphylococcus aureus</i> , устойчивость к метициллину и (частично) к ванкомицину <i>Helicobacter pylori</i> , устойчивость к кларитромицину <i>Campylobacter</i> spp., устойчивость к фторхинолонам <i>Salmonellae</i> , устойчивость к фторхинолонам <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , устойчивость к цефалоспорином и фторхинолонам
Средний	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , нечувствительность к пенициллину <i>Haemophilus influenzae</i> , устойчивость к ампициллину <i>Shigella</i> spp., устойчивость к фторхинолонам

*<https://www.who.int/ru/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

стать ориентиром в проведении научно-исследовательских и технологических работ (табл. 2).

В настоящее время накопилось достаточно доказательств, показывающих, что крупнейшим источником и наиболее значительным резервуаром резистентности является окружающая среда. Развитие устойчивости бактерий – это естественный и закономерный процесс. Однако человек значительно ускоряет его своими нерациональными действиями. Можно отметить несколько причин быстрого распространения антибиотикостойчивости у микроорганизмов.

- Необоснованное назначение антибиотиков. Антибиотики следует принимать только при подтвержденной бактериальной инфекции, но зачастую пациенты используют антибиотики при вирусных инфекциях. Назначение антибактериальных препаратов при острых респираторных вирусных инфекциях (ОРВИ) – наиболее частая ошибка. 22.04.2024 г Минздрав РФ утвердил стандарт медицинской помощи взрослым при ОРВИ (диагностика и лечение) [<http://publication.pravo.gov.ru/document/0001202404230009?index=1>], в котором антибиотики исключены из списка препаратов, зарегистрированных для лечения ОРВИ.

- Применение антибиотиков с целью профилактики бактериальных осложнений. Однако доказано, что вероятность развития таких ос-

ложнений практически одинакова как у принимавших, так и у не принимавших антибиотики.

- Неправильный выбор антибиотика. В начале лечения бактериальной инфекции врачу зачастую приходится действовать эмпирически. Препарат назначается практически наугад. Определение возбудителя и его чувствительности к антибиотикам занимает около трех дней, а иногда и больше. Но лечение нужно начинать немедленно, поэтому препараты назначают, исходя из особенностей клинической картины, условий возникновения инфекции (в стационаре, либо дома), учитывая прием антимикробных препаратов незадолго до заболевания и т.д.

- Несоблюдение дозы и кратности приема антибиотика. При лечении антибиотиками следует строго соблюдать назначенную лечащим врачом дозу и кратность приема. Это требуется для поддержания постоянной концентрации препарата в крови. В случае неправильного выбора антибиотика, его дозы, кратности либо длительности приема бактерии не погибнут, а мутируют с возможным образованием устойчивых штаммов.

- Безрецептурная продажа антибиотиков. Возможность приобрести антибактериальные препараты без рецепта усугубляет проблему резистентности. Только врач сможет оценить необходимость назначения препарата, выбрать

подходящую дозу, кратность приема и длительность курса.

- Нецелесообразное использование антибиотиков в сельском хозяйстве. Порядка 50% антибиотиков, производимых в мире, применяются и в сельском хозяйстве — для лечения животных и стимуляции роста, а также с целью увеличения сроков хранения продукции. Применение антимикробных препаратов в этих областях не всегда оправдано.

- Недостаточный контроль инфекций в поликлиниках и больницах, плохая гигиена и санация.

- Отсутствие новых видов антибиотиков и недостаток быстрых методов лабораторного анализа.

Таким образом, возникновение резистентности к антибиотикам в значительной степени обусловлено прямым ответом на злоупотребление антибиотиками в здравоохранении, промышленности и сельском хозяйстве. Почвенные, водные, атмосферные, животные, растительные и искусственные экосистемы являются “домом” для ми-

кробов, которые включают элементы резистентности и генетические средства их мобилизации.

Исследования разнообразия резистентности к антимикробным средствам в окружающей среде подтверждают долгую естественную историю этого явления. Так, сравнение геномов современных изолятов и штаммов, полученных из вечной мерзлоты (возраст 2.7 млн лет), не выявило существенных различий в профилях устойчивости к антибиотикам между древними и современными патогенами [2, 3]. Филогенетический анализ трехмиллионнолетней вечной мерзлоты, полученной на Мамонтовой горе в Сибири, показал, что гены, кодирующие β-лактамазы, присутствуют в плазмиде не менее 1 млн лет [4]. Согласно высказыванию А. Флеминга “Вероятно, не существует химиотерапевтического препарата, на которое в подходящих обстоятельствах бактерии не могут реагировать, каким-то образом приобретая устойчивость (резистентность)” [5].

Резистентность к антибиотикам может быть врожденной или приобретенной (рис. 2a). Врожденная резистентность — самый простой

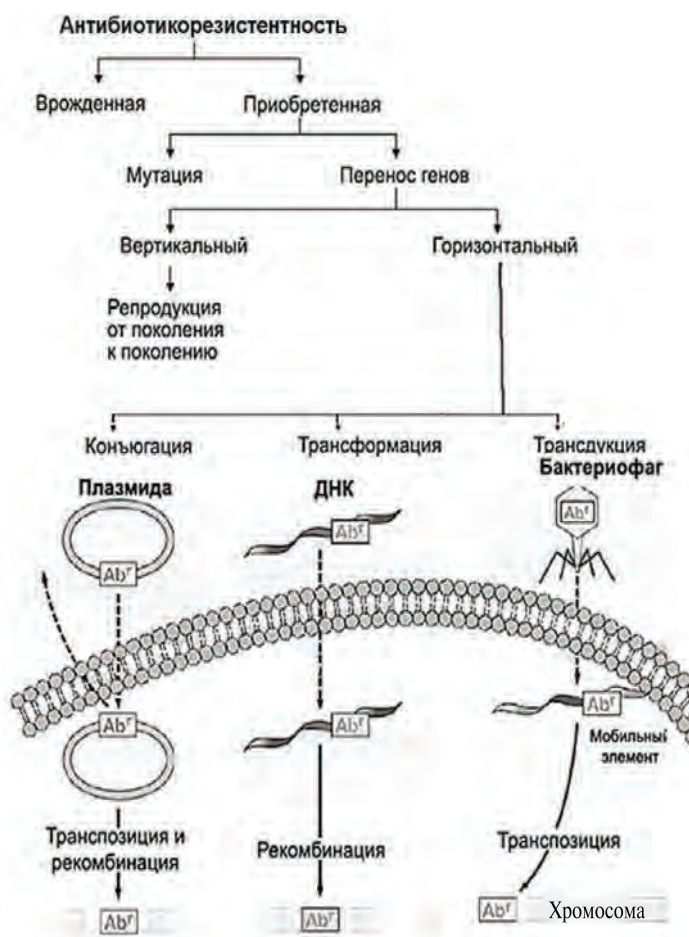


Рис. 2. Антибактериальная резистентность и пути ее приобретения. Ab^r — антибиотикорезистентность.

тип устойчивости – постоянный признак вида, штамма или целой группы бактерий. Врожденная резистентность к определенным группам антибиотиков может быть связана с отсутствием рецептора к антибиотику, низким сродством, непроницаемостью клеточной стенки или выработкой ферментов, модифицирующих/деградирующих антибиотик [6]. Для приобретения резистентности бактерии используют две основные генетические стратегии: мутации в генах, связанных с механизмом действия антибиотика, и приобретение чужеродной ДНК, кодирующей детерминанты устойчивости, посредством горизонтального переноса генов, конъюгации, трансформации или трансдукции (рис. 2б) [7].

Горизонтальный перенос играет важнейшую роль в распространении как известных, так и новых, еще не идентифицированных генов устойчивости, распространяя устойчивость за рамки

конкретных клонов. Тем самым горизонтальный перенос делает гены устойчивости доступными для гораздо большего количества бактерий, в том числе, преодолевая видовой барьер между патогенными и непатогенными бактериями в данной среде обитания микроорганизмов [8]. Горизонтальный перенос генов гораздо более вероятен между филогенетически близкими бактериями, он может индуцироваться такими стресс-факторами, как антибиотики, металлы и биоциды [9, 10]. Таким образом, горизонтальный перенос генов является, пожалуй, важнейшим механизмом приобретения резистентности микроорганизмами [11].

Как известно, действие антибиотиков направлено прежде всего на структуры и процессы в прокариотической клетке-мишени (патогене), имеющие существенные отличия от соответствующих эукариотических аналогов. В настоящее время действие подавляющей части анти-

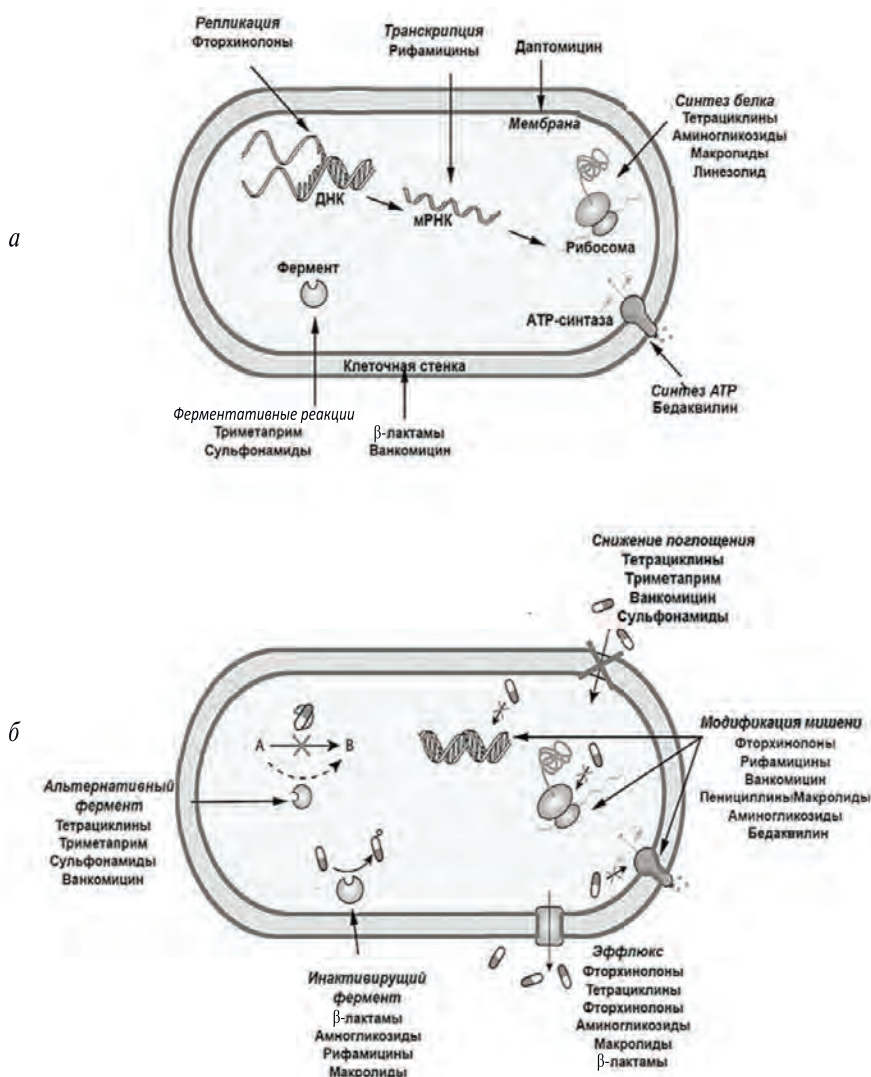


Рис. 3. Мишени действия антибиотиков (а) и основные механизмы резистентности (б) к ним.

биотиков направлено на ограниченное число мишеней (рис. 3а), среди которых синтез клеточной стенки, биосинтез белка, интактность мембраны и некоторые ферменты, в частности, связанные с метаболизмом ДНК/РНК, фолиевой кислоты [12], а также АТР-синтазы (противотуберкулезный антибиотик нового поколения бемаквилин [13, 14]).

На основе многочисленных научных исследований, проведенных с середины 20-го века, предложены механизмы, объясняющие резистентность бактерий к антибиотикам. В настоящее время считается, что существует как минимум пять механизмов приобретения устойчивости (рис. 3б), а именно: а) изменение проницаемости бактериальной мембраны через пориновые каналы, что ограничивает доступ противомикробных препаратов к соответствующим сайтам мишеней (например, устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к имипенему); б) увеличение эффлюкса (оттока) антибиотика из микробной клетки. Эффлюксные насосы — это мембранные белки, консервативные у многих организмов. Известно пять суперсемейств таких белков: 1) RND (Resistance-Nodulation-Division), 2) SMR (Small Multidrug Resistance), 3) MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion), 4) MFS (Major Facilitator Superfamily), 5) ABC (ATP-binding Cassette). *P. aeruginosa* приобретает множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) вследствие мутаций в регуляторных эффлюксных белках; в) ферментативная модификация или деградация антибиотика (β -лактамазы, разрушающие лактамные антибиотики; г) возникновение метаболических путей, альтернативных путям, которые ингибируются препаратом; д) мутации (модификации) мишеней антибиотиков [12]. Например, мутации гена *erm* у стрептококков групп С и G предотвращают связывание макролидных и линкозамидных антибиотиков и стрептограмма В с рибосомой [15].

Своеобразным типом резистентности является образование биопленок. Биопленка, хорошо известная как “слизь”, представляет собой прикрепленное к поверхности сообщество микроорганизмов. Считается, что 95–99% всех микроорганизмов в естественной среде существуют в виде биопленки. [16]. Микроорганизмы образуют биопленку под влиянием ряда факторов, включая клеточное распознавание мест прикрепления к поверхности и наличие питательных или агрессивных веществ, кислорода и т.д. Биопленки в целом более устойчивы к противомикробным средствам, чем свободноживущие бактерии. Фактором, способствующим устойчивости биопленки, считается неспособность антибактериальных агентов быстро проникнуть во все участки пленки. В режиме образования биопленки поведение

клетки изменяется, что обусловлено регуляцией экспрессии генов [17, 18].

Важным путем возникновения и распространения антибиотикорезистентности является образование в микробной популяции малочисленной (0.01–1%) субпопуляции клеток-персистеров, обладающих множественной лекарственной толерантностью, т.е. выживающих, но не размножающихся в присутствии антибиотиков [19]. Персистеры это не мутанты, а, скорее, фенотипические варианты дикого типа, которые образуются независимо от присутствия антибиотика или другого стрессора как выработанная в ходе эволюции конститутивная форма выживания популяции [20]. Для персистеров характерна толерантность к широкому кругу антибактериальных препаратов, с чем в значительной степени связана неспособность антибиотиков полностью искоренить инфекции. Основным свойством персистеров считается их способность выживать в присутствии летальных доз антибиотиков и ревертировать к пролиферации в свежей среде с образованием популяции, подобной родительской, состоящей преимущественно из чувствительных к антибиотикам клеток и малочисленной субпопуляции персистеров [21]. Персистеры были открыты в 1944 г. [22], но прогресс в их изучении наметился только в последние годы, что связано, главным образом, с трудностями выделения этих “неуловимых” клеток из популяции дикого типа.

В табл. 3 суммированы данные о механизмах действия основных классов антибиотиков и механизмах образования резистентности к ним.

Из приведенных данных видно, что разработка новых противомикробных средств и новых методик лечения инфекционных заболеваний является одной из насущных проблем здравоохранения. Ситуацию усугубляет снижение количества новых антимикробных препаратов, вызванное отсутствием жизнеспособного рынка, проблемы доступа — финансовые и практические, а также качество существующих препаратов. Поиск новых антибиотиков и разработка лекарств на их основе — весьма затратный процесс — от 800 млн до 1 млрд долларов необходимо, чтобы вывести на рынок новый препарат, и более 10 лет для того, чтобы он поступил в клинику [23]. Следует отметить также, что прямая замена противомикробных препаратов предлагает лишь краткосрочное решение, откладывая развитие резистентности на некоторое время. В связи с этим в настоящее время успешно реализуются стратегии преодоления устойчивости к антибиотикам, основанные на альтернативных подходах.

Таблица 3. Основные классы антибиотиков, основные мишени и механизмы резистентности*

Класс антибиотика (примеры)	Механизм действия	Механизм резистентности
<i>Мишень – клеточная стенка</i>		
β-лактамы (пенициллины, цефалоспорины, цефамицины, карбапенемы, монобактамы)	Ингибирование пенициллинсвязывающих белков, сшивающих пептидные цепи в пептидогликане клеточной стенки, что приводит к лизису клетки	Продукция β-лактамаз; модификация пенициллинсвязывающих белков; пониженная проницаемость, увеличение эффлюкса
Гликопептиды (ванкомицин)	Ингибирование синтеза пептидогликана клеточной стенки путем связывания с <i>D</i> -аланил- <i>D</i> -аланином в пептидной цепи	Нативная резистентность грамотрицательных клеток из-за непроницаемой внешней мембраны; в грамположительных клетках ферменты могут модифицировать и гидролизовать предшественники пептидогликана; мутации, приводящие к утолщению мембраны и низкой проницаемости
<i>Мишень – генетический аппарат клетки</i>		
Хинолоны и фторхинолоны (ципрофлоксацин)	Ингибируют ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, которые участвуют в суперспирализации, разрыве и лигировании цепей ДНК	Мутации ДНК-гиразы или топоизомеразы IV; эффлюкс хинолонов или белков, защищающих указанные ферменты
Рифамицины (рифампицин)	Ингибируют транскрипцию путем связывания с РНК-полимеразой	Мутации субъединицы РНК-полимеразы RpoB; ферментативное рибозилирование или инактивация рифампицина
<i>Мишень – рибосома</i>		
Аминогликозиды (стрептомицин)	Взаимодействие с 30S субъединицей рибосомы, приводящее к неправильному считыванию и/или укорачиванию белков и гибель клеток	Ферменты, модифицирующие аминогликозиды; мутации в гене 16S рРНК; метилазы рибосом; уменьшение поглощения и/или увеличение эффлюкса
Тетрациклины (тетрациклин)	Ингибирование трансляции путем связывания с 16S рРНК 30S субъединицы рибосомы, предотвращая связывание тРНК с 30S в А-сайте	Эффлюкс; белок-опосредованная защита рибосом; мутации в рибосоме; ферментативная инактивация препарата
Линкозамиды (клиндамицин) и стрептограммины (далфопристин)	Воздействие на 23S рРНК 50S субъединицы рибосомы; вызывают укорачивание пептидных цепей	Метилтрансферазы, модифицирующие 23S рРНК182; экспрессия белков, инактивирующих линкозамиды и стрептограммины; эффлюкс
Макролиды (азитромицин, эритромицин)	Воздействие на 23S рРНК 50S субъединицы рибосомы; вызывает укорачивание пептидных цепей	рРНК-метилтрансферазы, метилирующие 23S рРНК; мутации в рибосоме; эффлюкс; макролидные фосфотрансферазы и эстеразы; защита рибосомы с помощью белков АТР-связывающей кассеты F (ABC-F)
Оксазолидиноны (линезолид)	Ингибируют трансляцию путем связывания с 23S рРНК 50S субъединицы и предотвращают образование функциональной субъединицы 70S	Модификации 23S рРНК, например, метилтрансферазами; защита рибосомы посредством белков ABC-F
Фениколы (хлорамфеникол)	Ингибирование трансляции, посредством связывания с сайтом А 50S субъединицы рибосомы	Мутации в 23S рРНК 50S субъединицы; ферментативная инактивация посредством ацетилтрансферазы

Окончание таблицы 3

Класс антибиотика (примеры)	Механизм действия	Механизм резистентности
<i>Мишень – клеточная мембрана</i>		
Катионные пептиды (колистин)	Связывание с липидом А в липополисахариде; увеличение проницаемости внешней мембраны, что вызывает гибель клеток	Модификация или удаление липида А
Липопептиды (даптомицин)	Встраивание в клеточную мембрану, снижение способности синтеза АТФ и последующая гибель клеток	Утолщение и увеличение положительного заряда клеточной стенки; уменьшение деполяризации мембраны, индуцированное липопептидами ⁵
<i>Мишень – метаболизм фолиевой кислоты</i>		
Сульфонамиды (сульфаметизол)	Блокируют синтез дигидрофолиевой кислоты, ингибируя дигидроптероатсинтазу и останавливая рост клеток	Мутации в гене дигидроптероатсинтазы
Пиримидины (триметоприм)	Блокируют синтез тетрагидрофолата путем ингибирования дигидрофолатредуктазы	Модификация или появление новых генов дигидрофолатредуктазы; эффлюкс
<i>Мишень – ингибирование АТФ-синтазы микобактерий</i>		
Диарилхинолины (бедаквилин)	Ингибирование АТФ-синтазы микобактерий	Мутации в С-субъединице АТФ-синтазы (ген <i>atpE</i>), эффлюкс

*Примечание. Жирным выделены препараты, оказывающие, главным образом, бактерицидное действие, курсивом – бактериостатическое.

• Известно, что некоторые металлы обладают противомикробным действием, поэтому металлические наночастицы могут влиять на выживаемость бактерий. Например, наночастицы серебра вызывают физический стресс бактериальных клеток. Другие данные свидетельствуют о том, что галлий может эффективно влиять на метаболизм бактерий, прерывая поглощение бактериями ионов металлов [24], что, в свою очередь, влияет на *P. aeruginosa*, образующую биопленки *in vitro*. Однако токсичность металлических наночастиц и узкий спектр их активности в целом остаются проблемой [25].

• Ряд исследований свидетельствует о том, что генетически модифицированные бактерии могут служить средством уничтожения патогенных бактерий. Так, модифицированные клетки *Escherichia coli* способны секретировать антимикробные пептиды в ответ на молекулы *quorum-sensing*, выделяемые *P. aeruginosa*. Эти антимикробные пептиды способны разрушать биопленку *P. aeruginosa*, что указывает на потенциальную возможность использования специально разработанных “бактерий-хищников” в борьбе с важными патогенами [26].

• Еще один вариант – непосредственное применение антимикробных пептидов. Эти соединения синтезируются на рибосоме и высту-

пают ключевыми молекулярными факторами врожденного иммунитета животных, растений и грибов, а также выполняют защитную и коммуникативную функции у бактерий [27, 28]. Антимикробные пептиды в перспективе могут оказаться весьма эффективными в борьбе с резистентными микроорганизмами, поскольку обладают такими свойствами, как широкий спектр антимикробной активности, быстрота действия, синергизм с конвенциональными антибиотиками, наличие внутриклеточных мишеней и др., приводящими к низкой вероятности развития резистентности [29]. Например, пексиганан, природный пептид, выделенный из кожи африканской когтистой лягушки, эффективно уничтожает как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии [30].

• Перспективным представляется и восстановление антибактериальной активности клинически важных антибиотиков, утративших эффективность вследствие резистентности бактерий. Неантибиотические соединения, восстанавливающие чувствительность устойчивых патогенов, называются потенциаторами, или адьювантами антибиотиков. Потенциаторы работают только в сочетании с антибиотиками и повышают их эффективность против устойчивого патогена. Механизмы действия потенциаторов весьма

разнообразны, они включают прямое ингибирование ферментов резистентности или эффлюксных насосов, увеличение проницаемости мембран или снижение стабильности и распространения плазмид, несущих гены резистентности [31].

• Весьма привлекательной представляется фаготерапия [32, 33]. СССР был пионером развития этого направления [34]. В ряде стран фаготерапия применяется уже давно; существуют специальные центры фаготерапии. Известны два основных направления фаготерапии (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24899282/>). Первое основано на применении стандартных препаратов, в рамках второго вирусы подбирают индивидуально для каждого конкретного пациента. Однако несмотря на привлекательность этого подхода, на пути его реализации имеются значительные препятствия. Одной из проблем является валидация качества препаратов, поскольку комбинации фагов или фаговых коктейлей часто непостоянны. Стабильность фагов и их антибактериальные свойства также требуют постоянной валидации. Тем не менее, фаготерапия интенсивно развивается, в настоящее время в России зарегистрировано 16 лекарственных препаратов на основе бактериофагов.

• Все большее внимание уделяется созданию вакцин. За последние 50 лет вакцины против возбудителей инфекционных заболеваний оказали огромное влияние на здоровье человека, эффективно контролируя, а в некоторых случаях искореняя многие заболевания как вирусные (оспа, корь и полиомиелит), так и бактериальные (дифтерия и столбняк), которые были причиной большого количества смертей и инвалидизации в 20 веке. Вакцины обладают рядом преимуществ перед антимикробными препаратами. Во-первых, они могут предотвратить заражение как устойчивыми, так и чувствительными к антибиотикам бактериями. Во-вторых, вакцины способны обеспечить коллективный иммунитет, защищая непривитых за счет сокращения передачи возбудителей инфекции. В-третьих, антибиотики часто назначают при вирусных инфекциях, чтобы предотвратить любые потенциальные вторичные последствия, вызванные бактериальной инфекцией. Программы вакцинации могут предотвращать развитие вирусной инфекции (хотя следует отметить, что вирусы, как правило, лучше сопротивляются вакцинации в связи с более высокой скоростью мутирования), в результате чего можно впоследствии снизить дозу антибиотиков и, тем самым, бороться с ростом антибиотикорезистентности.

Применение вакцин также осложняется аллергическими реакциями, в том числе анафилактическим шоком. Тем не менее, вакцины потенциально являются одним из основных средств ограничения антибиотикорезистентности, они имеют огромный потенциал для снижения использования антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве [35].

Сказанное выше отнюдь не умаляет роль антибиотиков и других антимикробных препаратов, которые, несмотря на серьезные угрозы развития резистентности, остаются препаратами первой линии при наиболее опасных инфекционных заболеваниях. Поиск новых антимикробных средств, а также восстановление активности клинически важных антибиотиков остается, на наш взгляд, магистральным путем развития фармацевтики.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 23-14-00106).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. **399**(10325), 629–655.
2. Jacoby G.A. (2017) History of drug-resistant microbes. In: *Antimicrobial Drug Resistance*. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, pp. 3–8.
3. Perry J., Waglechner N., Wright G. (2016) The pre-history of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a025197.
4. Barlow M., Hall B.G. (2002) Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J. Mol. Evol.* **55**, 314–321.
5. Sir Alexander Fleming – Nobel Lecture – Nobel-Prize.org.” n.d. Nobel Prize. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/>
6. Urban-Chmiel R., Marek A., Stepień-Pyśniak D., Wiczorek K., Dec M., Nowaczek A., Osek J. (2022) Antibiotic resistance in bacteria – a review. *Antibiotics*. **11**, 1079. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>
7. Munita J.M., Arias C.A. (2016) Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**, 1–37.
8. Martinez J.L. (2011) Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **2**, 265.
9. Jutkina J., Marathe N.P., Flach C.F., Larsson D.G.J. (2018) Antibiotics and common antibacterial biocides

- stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Sci. Total Environ.* **616–617**, 172–178.
10. Zhang Y., Gu A.Z., He M., Li D., Chen J. (2017) Subinhibitory concentrations of disinfectants promote the horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across genera. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 570–580.
 11. Kumar M., Sarma D.K., Shubham S., Kumawat M., Verma V., Nina P.B., Devraj J.P., Kumar S., Singh B., Tiwari R.R. (2021) Futuristic non-antibiotic therapies to combat antibiotic resistance: a review. *Front. Microbiol.* **12**, 609459. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609459>
 12. Щекотихин А.Е., Олсуфьева Е.Н., Янковская В.С. (2022) Антибиотики и родственные соединения. Москва: Лаборатория знаний.
 13. Diacon A.H., Pym A., Grobusch M., Patientia R., Rustomjee R., Page-Shipp L., Pistorius C., Krause R., Bogoshi M., Churchyard G., Venter A., Allen J., Palomino J.C., De Marez T., van Heeswijk R.P., Lounis N., Meyvisch P., Verbeeck J., Parys W., de Beule K., Andries K., Mc Neeley D.F. (2009) The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **360**(23), 2397–2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808427>
 14. Biukovic G., Basak S., Manimekalai M.S., Rishikesan S., Roessle M., Dick T., Rao S.P., Hunke C., Gruber G. (2013) Variations of subunit e of the *Mycobacterium tuberculosis* F1Fo ATP synthase and a novel model for mechanism of action of the tuberculosis drug TMC207. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 168–176.
 15. Van Hoek A.H., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J. (2011) Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* **2**, 203. <https://doi.org/10.1016/j.totert.2023.100068>
 16. Rather M.A., Gupta K., Mandal M. (2021) Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz. J. Microbiol.* **52**, 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
 17. Jamal M., Tasneem U., Hussain T., Andleeb S. (2015) Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Res. Rev. J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 1–153.
 18. Holse M.B., Gulati M., Johnson A.D., Nobile C.J. (2018) Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
 19. Lewis K. (2010) Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 357–372.
 20. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**, 13–18.
 21. Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.M., Hardt W.D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.W., Tenson T., Van Melderen L., Zinkernagel A. (2019) Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 441–448.
 22. Bigger J. (1944) Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet.* **244**, 497–500.
 23. Yahav D., Shepshelovich D., Tau N. (2021) Cost analysis of new antibiotics to treat multidrug-resistant bacterial infections: mind the gap. *Infect. Dis. Ther.* **10**, 621–630.
 24. Minandri F., Bonchi C., Frangipani E., Imperi F., Visca P. (2014) Promises and failures of gallium as an antibacterial agent. *Future Microbiol.* **9**(3), 379–397.
 25. Lemire J.A., Harrison J.J., Turner R.J. (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets, and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**(6), 371–384.
 26. Hwang I.Y., Tan M.H., Koh E., Ho C.L., Poh C.L., Chang M.W. (2014) Reprogramming microbes to be pathogen-seeking killers. *ACS Synth Biol.* **3**(4), 228–237.
 27. Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* **415**, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
 28. Peters B.M., Shirtliff M.E., Jabra-Rizk M.A. (2010) Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* **6**, e1001067. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>
 29. Сафронова В.Н., Болосов И.А., Пантелеев П.В., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. (2023) Терапевтический потенциал и перспективы применения антимикробных пептидов в эпоху глобального распространения антибиотикорезистентности. *Биоорг. химия.* **49**(3), 243–258.
 30. Flamm R.K., Rhomberg P.R., Simpson K.M., Farrell D.J., Sader H.S., Jones R.N. (2015) In vitro spectrum of pexiganan activity when tested against pathogens from diabetic foot infections and with selected resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**(3), 1751–1754.
 31. Chawla M., Verma J., Gupta R., Das B. (2022) Antibiotic potentiators against multidrug-resistant bacteria: discovery, development, and clinical relevance. *Front. Microbiol.* **13**, 887251. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.887251>
 32. Reardon S. (2014) Phage therapy gets revitalized *Nature.* **510**(7503), 15–16. <https://doi.org/10.1038/510015a>
 33. Летаров А.В. (2019) Современные концепции биологии бактериофагов. М.: ДеЛи.
 34. Ильина Т.С., Толордава Э.Р., Романова Ю.М. (2012) Взгляд на фаготерапию через 100 лет после открытия бактериофагов. *Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол.* **37**(3), 103–112.
 35. Mustefa Ame M., Mume D. (2023) Review on the global public health issue of antibiotic resistance and potential solutions. *Publ. H Open. Acc.* **7**(1), 000233.

Antibiotic Resistance: Threats and Search for an Escape

S. N. Kochetkov^{1, *}

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy
of Sciences Institute, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: snk1952@gmail.com*

Antibiotic and, more broadly, antimicrobial resistance is a naturally occurring biological phenomenon and a major public health problem. The first cases of mass emergence of drug-resistant strains of bacteria were observed in the mid-20th century; Since then, cases of resistance have been reported worldwide, and in the last two decades, multiple bacterial resistance has been increasingly reported. Factors contributing to the development of bacterial resistance include the overuse of antibacterial agents in humans or livestock and the release of antibacterial agents into the environment. Unfortunately, the development of new effective antibiotics is declining, which requires strengthening this work, as well as the search for alternative methods of treating infectious diseases.

Keywords: antibiotics, antimicrobials, resistance, environment

УДК 577.113.7

ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ ГЛИКОПЕПТИДОВ

© 2024 г. Е. Н. Олсуфьева^{а, *}^аИнститут по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

*e-mail: eolsufeva@list.ru

Поступила в редакцию 29.02.2024 г.

После доработки 06.05.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

Появление штаммов бактерий, обладающих повышенной устойчивостью к полициклическим гликопептидным антибиотикам, стало серьезной проблемой химиотерапии заболеваний, вызванных такими бактериями. Химическая модификация известных природных антибиотиков является основным направлением создания антиинфекционных препаратов нового поколения. За последние два десятилетия разработана серия аналогов гидрофобных гликопептидов, активных против резистентных штаммов грамположительных бактерий, три из которых – оритаванцин, телаванцин и далбаванцин – одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA, США) в 2013–2014 гг. для применения при инфекциях, вызванных чувствительными и резистентными штаммами стафилококков и энтерококков. Установлено, что гидрофобные производные гликопептидов могут действовать на резистентные штаммы бактерий по механизму, не допускающему связывания с модифицированной мишенью устойчивых бактерий. Для рационального создания эффективных антибактериальных соединений необходимо понимание тонкого механизма действия природных и модифицированных гликопептидов. Рассмотрена также возможность использования полусинтетических аналогов гликопептидов для борьбы с инфекциями, вызванными оболочечными вирусами. В обзоре обсуждаются основные пути химического дизайна гликопептидных антибиотиков нового поколения, способных преодолеть резистентность к грамположительным патогенам, и механизмы их действия.

Ключевые слова: антибиотики, гликопептиды, резистентность, механизм действия, антибактериальная активность, противовирусная активность

DOI: 10.31857/S0026898424060029, **EDN:** HNBCOO

ВВЕДЕНИЕ

В результате широкого применения антибиотиков, особенно в агропромышленном комплексе, появились и широко распространились штаммы патогенных микроорганизмов, устойчивые ко многим антибиотикам [1–3].

Применение антибиотиков в производстве пищевых продуктов, в частности молочных, создает предпосылки для их попадания в организм человека, особенно детей, что неблагоприятно сказывается

на здоровье [4]. Особую тревогу вызывает быстрое распространение так называемых супербактерий (superbugs), обладающих пан-устойчивостью и вызывающих инфекции, которые не поддаются лечению существующими противомикробными препаратами [5]. Обычно множественная лекарственная устойчивость развивается естественным путем, при этом при иммунодефицитных состояниях, таких как сахарный диабет, тяжелые ожоговые травмы, HIV-инфекция, COVID-19, а также у реципиентов, перенесших трансплантацию органов, повышена

Сокращения: ABSSSI – острые бактериальные инфекции кожи и структур кожи; Adoc – адамантил-1-оксикарбонил; BOC – трет-бутилоксикарбонил; Bz – бензил; Bzl – бензоил; ESI MS – масс-спектрометрия с электрораспыленным распылением; GRE – энтерококки, устойчивые к гликопептидным антибиотикам; HIV-1 – вирус иммунодефицита человека; MRSA – метициллинуустойчивый *S. aureus*; MRSE – метициллинрезистентный *S. epidermidis*; MSSA – метициллинчувствительный *S. aureus*; NAM-NAG – дисахарид *N*-ацетилмурамовой кислоты и *N*-ацетилгликозамина; REDOR – ядерный магнитный резонанс с двойным резонансом вращательного эхо-сигнала; VanA, VanB и VanC – энтерококки с определенным генотипом (A, B и C), устойчивые к ванкомицину; VRE *faecium* – ванкомицинрезистентный *Enterococcus faecium*; VISA – *S. aureus* со средним уровнем устойчивости; VRSA – ванкомицинрезистентный *S. aureus*; МПК – минимальная концентрация антибиотика, вызывающая гибель 100% микроорганизмов.

частота инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами [6].

В 2008 г. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) опубликовала так называемый список ESKAPE, в который вошли шесть опасных с точки зрения развития резистентности патогенных бактерий: *Enterococcus faecium*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterobacter* spp. В 2013 году к этому списку добавили еще 14 крайне опасных штаммов бактерий: *A. baumannii* (устойчивый к карбапенемам), *P. aeruginosa* (устойчивый к карбапенемам), *Enterobacteriaceae* (устойчивые к карбапенемам третьего поколения, устойчивые к цефалоспорином), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *S. aureus* (устойчивый к ванкомицину и к метициллину), *Streptococcus pneumoniae* (нечувствительный к пенициллину), *Campylobacter* sp. (устойчивый к фторхинолонам), *Haemophilus influenzae* (устойчивый к ампициллину), *Helicobacter pylori* (устойчивый к кларитромицину), *Neisseria gonorrhoeae* (устойчивый к цефалоспорином третьего поколения и фторхинолонам), *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* (устойчивый к фторхинолонам). Большую опасность представляют также биопленки, которые образуют многие клинически важные бактерии: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* [7].

В 2017 г. была утверждена стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г., в рамках которой приоритетным должно стать создание новых поколений антибиотиков, преодолевающих резистентность бактерий к лекарственным препаратам [8].

Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе со дня основания и на протяжении многих лет является головным учреждением по созданию антибиотиков новых поколений [9]. Особое место в создании и изучении механизмов действия занимали и занимают полусинтетические антибиотики на основе природных полициклических гликопептидов, к которым относятся ванкомицин (1) [10], тейкопланин (2) [11] и антибиотик эремомицин (3), открытый в Институте и превышающей по своей активности 1 (рис. 1) [12].

К настоящему моменту опубликована серия обзоров, посвященных проблеме преодоления резистентности бактерий к этой группе антибиотиков. Наиболее полный обзор Van Groesen и соавт. [13] носит общеознакомительный характер и рассматривает последние достижения в создании полусинтетических гликопептидных антибиотиков нового поколения. Приведен подробный анализ структура-активность больших групп полусинтетических аналогов гликопептидов, обобщены некоторые закономерности. Об-

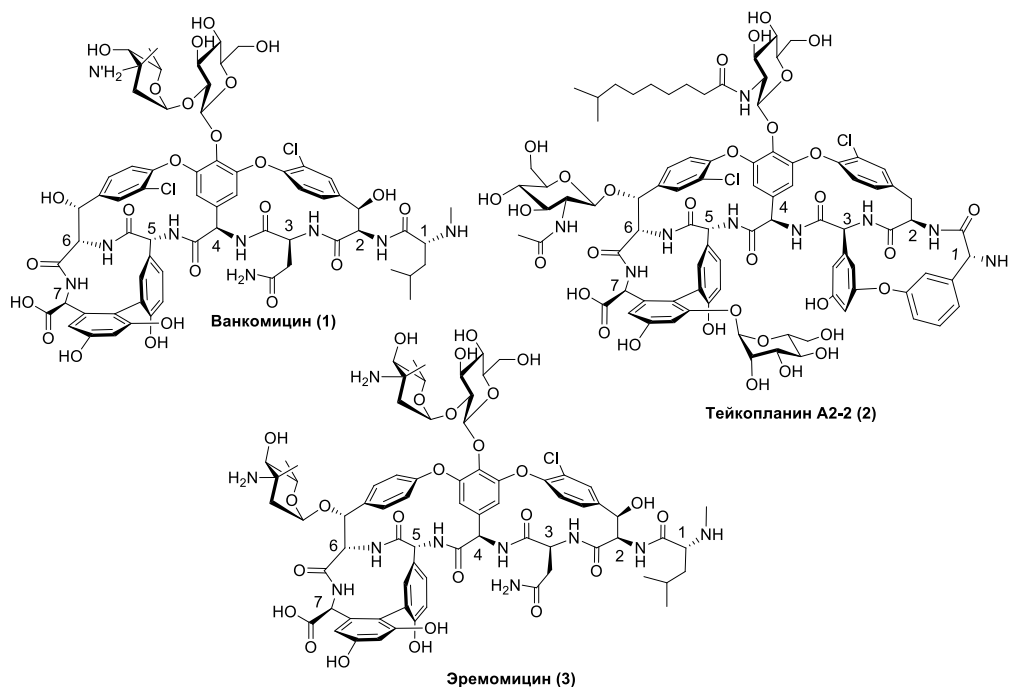


Рис. 1. Структуры природных гликопептидов: ванкомицина (1), тейкопланина A2-2 (2) и эремомицина (3).

суждаются также вопросы преодоления резистентности, однако механизмы антимикробного действия антибиотиков этой группы практически не рассматриваются.

Поиск новых более совершенных лекарственных средств неотделим от изучения механизмов их действия на микро- и макроорганизмы. Представленный обзор посвящен анализу путей, которые привели к успешному созданию и внедрению в медицинскую практику высокоэффективных антибиотиков группы полициклических антибиотиков, преодолевающих резистентность клинически важных грамположительных энтерококков и стафилококков. Одновременно рассматривается развитие представлений о механизмах действия антибиотиков этого класса. Уделено внимание также перспективе создания на основе природных гликопептидов противовирусных препаратов, направленных на оболочечные вирусы, в том числе на HIV, вирус гепатита С (HCV), SARS-CoV-2 и др.

В заключении рассмотрены такие направления создания полициклических гликопептидов нового поколения, как конструирование гибридных структур, содержащих другие антибиотики или фармакофорные группы, которые могут привести к появлению активности в отношении грамотрицательных бактерий, а также использование знаний о путях биосинтеза антибиотиков. Настоящий обзор носит ретроспективный характер, он охватывает период времени от открытия первых антибиотиков этой группы до настоящего времени. Обзор включает собственные экспериментальные и теоретические исследования автора.

ПРИРОДНЫЕ ГЛИКОПЕПТИДЫ

Основными антибиотиками, активными против патогенных бактерий *E. faecium* и *S. aureus* из списка ESKAPE, являются природные полициклические гликопептидные антибиотики группы ванкомицина (1)–тейкопланина (2) (рис. 1), а также некоторые их полусинтетические аналоги. Гликопептиды не могут проникать через клеточную стенку грамотрицательных бактерий, поэтому обычно они эффективны только при инфекциях, вызванных восприимчивыми грамположительными возбудителями. Эти антибиотики относятся к препаратам последнего выбора при заболеваниях, вызываемых метициллинустойчивыми штаммами стафилококков из-за высокой частоты ассоциированной устойчивости патогенов к препаратам других классов. Они традиционно используются при энтерококковых инфекциях, вызванных штаммами, устойчивыми к β-лактамам антибиотикам.

Ванкомицин (1) применяется в клинике более 70-ти лет для лечения инфекций, вызванных метициллинустойчивым штаммом *S. aureus* (MRSA), метициллинустойчивым *S. epidermidis* (MRSE) и амоксициллинустойчивыми энтерококками. В пероральной форме ванкомицин используется при диарее, вызванной *Clostridium difficile* [14]. Основным побочным эффектом применения ванкомицина является так называемый эффект “красного лица”. Считается, что это опосредовано высвобождением гистамина из тучных клеток и рассматривается как псевдоаллергическая реакция на лекарственный препарат.

Применение тейкопланина (2) было одобрено в Европе в 1988 г. через 2 года после первого успешного лечения инфекций костей и мягких тканей, эндокардита, пневмонии и сепсиса. Тейкопланин (2) не вызывает псевдоаллергических реакций, проявляет высокую эффективность при стафилококковых и энтерококковых инфекциях различных органов, благодаря хорошему распределению и оптимальному времени удерживания в тканях [11].

УСТОЙЧИВОСТЬ К ГЛИКОПЕПТИДАМ

Первое сообщение об устойчивости энтерококков *E. faecium* к ванкомицину появилось только в конце 80-х годов. К настоящему времени описано более 10 фенотипов энтерококков, устойчивых к гликопептидным антибиотикам GRE (от A до N) [15]. Грамотрицательные бактерии обладают природной устойчивостью к гликопептидным антибиотикам, которые не могут проходить через наружную оболочку этих бактерий.

Наиболее распространенными штаммами энтерококков, устойчивыми к ванкомицину, являются штаммы типа VanA и VanB. Резистентность грамположительных бактерий к гликопептидам носит индуцибельный характер и опосредуется достаточно сложными механизмами. В формировании пептидогликана наружной стенки у многих бактерий участвует большой мультиферментный комплекс. В норме гликопептиды чувствительных к антибиотику грамположительных бактерий прочно связываются с концевым дипептидом -D-Ala-D-Ala, входящим в состав предшественника пептидогликана – дисахаридпентапептида – основного компонента клеточной стенки. Такое связывание приводит к подавлению последних стадий биосинтеза пептидогликана – включения предшественника в растущую цепь биополимера и образования поперечных сшивок. При этом может ингибироваться работа как трансгликозилазы, сшивающей дисахаридпептидные мономеры, имеющие концевые остатки D-Ala-D-Ala, так и транспептидазы, которая сшивает эти пептиды с образованием трехмерной структуры, отщепляя

последний остаток *D*-Ala с формированием мостика между строительными блоками [16].

У одних бактерий пептидным мостиком служит пентапептид (Gly)₅, а у других – остаток мезо- α - γ -диаминопимелиновой кислоты, соединяющий вторую пептидную цепь через γ -аминогруппу Lys. На рис. 2а показано ингибирование работы этих ферментов за счет образования прочного комплекса антибиотика с мишенью Ac₂-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala, который имеет высокую константу связывания ($K_a \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) с агликоном ванкомицина (4).

Ванкомицин (1) имеет связывающий карман, образованный агликоновым фрагментом, способным образовывать пять водородных связей между концевой метиламиногруппой и амидными группами пептидного кора с карбоксильной группой и амидными группами трипептида. Боковые радикалы аминокислотных остатков АК1 и АК3 дополнительно “формируют” стенки этого кармана (рис. 2а). У штаммов

энтерококков с фенотипами VanA и VanB вместо дипептида *D*-Ala-*D*-Ala находится модифицированный предшественник с концевым остатком *D*-Ala-*D*-Lac. При этом аффинность гликопептидов к нему резко снижена ($K_a \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$) [17]. Такая замена “убирает” одну водородную связь и вызывает отталкивание карбоксильной группы АК4 от кислорода сложноэфирной группы депсипептида (рис. 2б).

Появление резистентности стало возможным благодаря изменению биосинтеза клеточной стенки бактерии. В биосинтезе конечного дипептидного предшественника участвует кластер из нескольких генов, отвечающий “за работу” *D*-Ala-*D*-Хаа-лигазы. В случае мутации гена *vanA* в активном центре соответствующего фермента происходит замена остатка Tug на Phe. При этом *D*-Ala-*D*-Хаа-лигаза теряет субстратную специфичность и использует в качестве субстрата как *D*-Ala-*D*-Ala, так и *D*-Ala-*D*-Lac. [18]. Штаммы VanA и VanB энтерококков имеют определенные различия в структуре внешней оболочки, поэто-

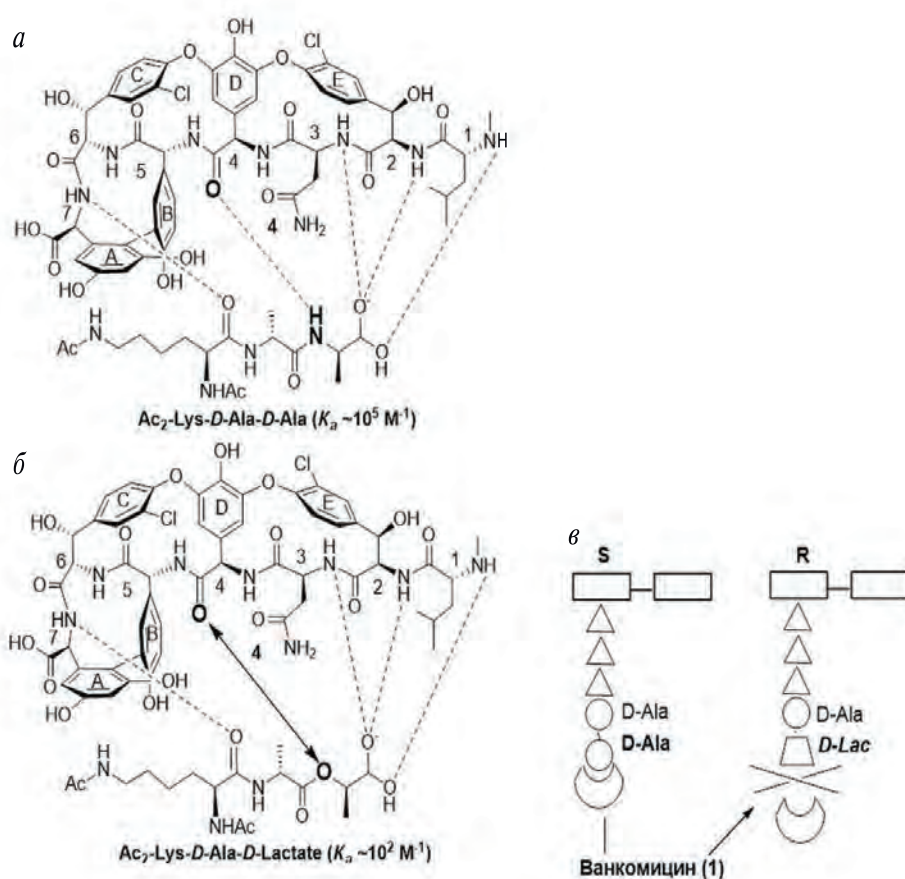


Рис. 2. Взаимодействие агликона ванкомицина (4) с пептидом Ac₂-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala ($K_a \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) (а) и депсипептидом Ac₂-Lys-*D*-Ala-*D*-Lac ($K_a \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$) (б). Схема механизма чувствительности (S) и устойчивости (R) *E. spp.* к ванкомицину (1) (в). Пунктирными линиями показаны водородные связи, стрелками – отталкивание между атомами кислорода молекулы антибиотика и мишени.

му некоторые гликопептиды, например тейкоплатин (2), не действуют на VanA-бактерии, но активны в отношении VanB [19]. Обнаружены штаммы *S. haemolyticus*, устойчивые к (2) и при этом чувствительные к (1). Устойчивость (2) к таким штаммам ассоциирована с мутацией в гистидинкиназах *VraS* и *WalK* [20].

Резистентность энтерококков к ванкомицину (1) определяется двухкомпонентной ферментной системой, состоящей из рецепторной гистидинкиназы *VanS* и регулятора ответа *VanR*. Гистидинкиназа *VanS*, выступающая как рецептор (1), распознает его и индуцирует экспрессию генов *vanH*, *vanA* и *vanX*, ответственных за синтез клеточной стенки с участием *D-Ala-D-Lac* [19].

Штамм *S. aureus* с устойчивым фенотипом VanA (VRSA), получен от пациента, коинфицированного ванкомицинрезистентным *E. faecalis*, что предполагает горизонтальный перенос генов, опосредованный транспозоном Tn1546 [21]. Кроме клинических штаммов GRE и VRSA, существуют другие грамположительные бактерий, такие как *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, устойчивые ко всем гликопептидам, в состав клеточной стенки которых входит остаток *D-Ala-D-Lac* [18].

В клинических условиях выявлены также штаммы золотистого стафилококка со средним уровнем устойчивости к ванкомицину (VISA) и резистентные (VRSA) (МПК > 8 мкг/мл) или, соответственно, полностью устойчивые к антибиоту. Инфекции, обусловленные этими патогенами, не поддаются лечению даже возрастающими дозами препарата. Механизм действия у них иной – считается, что (1) индуцирует у таких бактерий значительное утолщение наружной клеточной стенки, поэтому антибиотик не способен преодолеть такой барьер [21].

Ранее из актиномицета *Amycolatopsis orientalis* в Институте был выделен оригинальный гликопептидный антибиотик эремомицин (A82846A, MM45289) (3), структурно схожий с ванкомицином (1), но существенно превосходящий его по активности в отношении большинства штаммов грамположительных бактерий *in vitro* и *in vivo* [12]. Клинические испытания (3) были приостановлены из-за проявления псевдоаллергической реакции, характерной и для (1), однако (3) оказался важным для получения новых полусинтетических аналогов с улучшенными свойствами, а также для подробного изучения механизмов действия антибиотиков этой группы [22].

ХИМИЧЕСКИЙ ДИЗАЙН ГЛИКОПЕПТИДОВ

Направленный дизайн гликопептидных антибиотиков группы ванкомицина–тейкоплатина

может осуществляться по двум основным путям: во-первых, усиления взаимодействия с мишенью, измененной в резистентных бактериях, во-вторых, путем поиска возможности связывания с дополнительными мишенями в клетке.

Модификации могут подвергаться функциональные группы антибиотика как в области связывающего кармана, так и в периферийных областях молекулы. Предполагается, что изменить химические связи и физико-химические характеристики молекулы антибиотика (например, распределение зарядов, диполей, т.е. изменить амфифильность) [22] можно путем: 1) усиления взаимодействия фрагмента N-концевой группы пептидного кора в так называемом карбоксилат-связывающем кармане; 2) модификации аминокислот вблизи связывающего кармана; 3) нивелирования отталкивания атомов кислорода посредством модификации пептидной связи между остатками аминокислот АК4-АК5.

В Институте впервые были разработаны основные методы химической трансформации эремомицина (3) как в области связывающего кармана, так и в периферийной части молекулы (рис. 3, конкретные примеры см. ниже). В результате производные получили модификацией: аминокислота дисахаридной ветви АК4 (1), карбоксильной группы АК7 (2), бокового фенольного радикала АК7 по реакции Манниха (3), амидной группы АК3 Asn (4), NMe-концевой группы АК1 (5), отщеплением АК1 по Эдману (6) и гидролизом сахаров с образованием агликона (7). Параллельно изучали и реакции трансформации других гликопептидов – ванкомицина (1) и тейкоплатина (2) (особенности химических свойств и механизмов действия эремомицина (3) и его производных рассмотрены ниже).

Как типичный полициклический гликопептид эремомицин (3) имеет связывающий карман, определяющий прочность комплекса с лигандом Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala [23]. На рис. 4 представлена пространственная модель Стюарта–Бриглеба комплекса молекулы эремомицина (3) с лигандом Ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala [24]. Поскольку карбоксильная группа мишени является ключевой для связывания как с чувствительной мишенью, так и с резистентной, химическая модификация была направлена на усиление связывания этой отрицательно заряженной группы с N-концевым фрагментом пептидного кора антибиотика за счет общего увеличения его основности.

В рамках этого подхода (рис. 5a) в бис-N-Bz-производном эремомицина N-концевой остаток N-Me-D-Lys был заменен на радикал (R, S)-4-метилпентил-2-амин с образованием соединения (3a), теоретически обладающего большей основ-

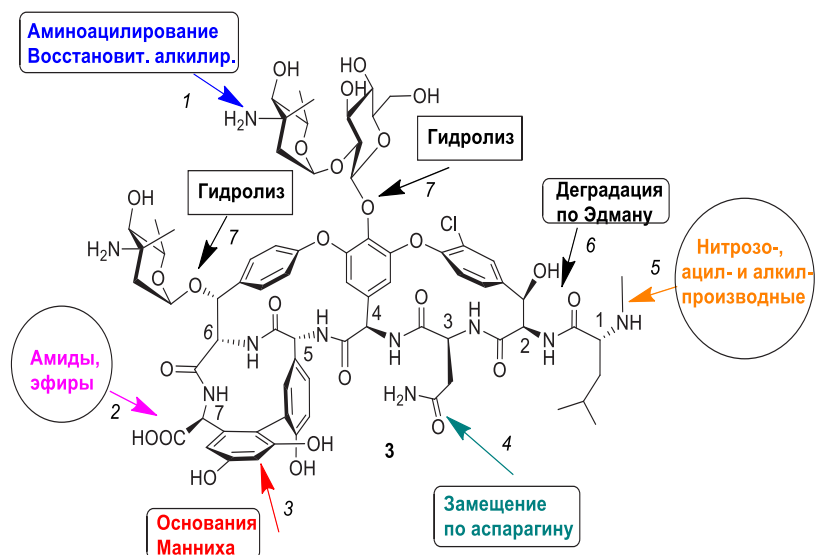


Рис. 3. Основные пути химической трансформации гликопептидных антибиотиков на примере эремомицина (3). Цветными стрелками показаны модификации целой молекулы, черными – реакции частичной деградации.

ностью. Однако такая модификация не привела к ожидаемому увеличению активности.

Большая стабильность молекулы эремомицина в щелочных условиях по сравнению с молекулой ванкомицина, позволила ввести модификацию вблизи связывающего кармана по АК3. Путем избирательного превращения амидной группы Asn (АК3) в карбоксильную группу Asp с последующим амиди-

рованием адамантил- и *n*-дециламинол (одновременно с реакцией по карбоксильной группе АК7) были получены бисамиды (3b) и (3c) (рис. 5b) [25].

Эти гидрофобные амиды обладали достаточно заметной активностью в отношении грамположительных бактерий, включая клинические изоляты, в частности энтерококки VanA (МПК = 8 мкг/мл). Возможные механизмы действия гидрофобных производных гликопептидов рассмотрены ниже.

Исходя из соответствующих дегликозилированных производных эремомицина и тейкоплатина, была предпринята попытка изменить характер боковых радикалов концевой АК1 [26] или одновременно АК1 и АК3 (рис. 6) [27], формирующего связывающий карман путем изменения гидрофобно-гидрофильных свойств этих аминокислот. Так, например, остатки Lys и His содержат аминогруппу, способную к протонированию, а остатки MeLeu, Phe и Trp носят выраженный гидрофобный характер. Замену концевой остатка АК1 *D*-MeLeu на *D*-Lys, *D*-Trp и *D*-His (соединения 5a-c) осуществили, исходя из агликона эремомицина (5), в реакции Эдмана с образованием промежуточного гексапептида с последующим введением соответствующих аминокислот путем стандартного пептидного синтеза.

Модификация с замещением одновременно АК1 и АК3 проведена путем открытой итальянскими исследователями уникальной реакции восстановительного расщепления (избытком NaBH_4 в EtOH) пептидной связи АК2-АК3 гликопептидов, сопровождающейся трансформацией СО-группы до ОН-группы АК2 [28].

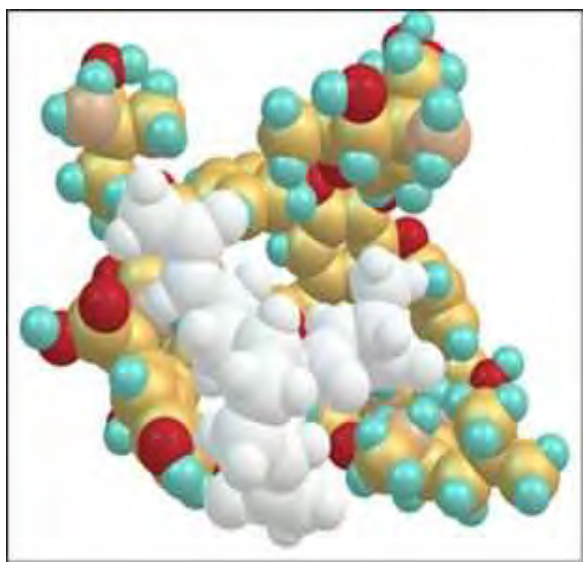


Рис. 4. Модель Стюарта–Бриглеба комплекса эремомицина (3) (цветные атомы) с лигандом $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$ (атомы белого цвета).

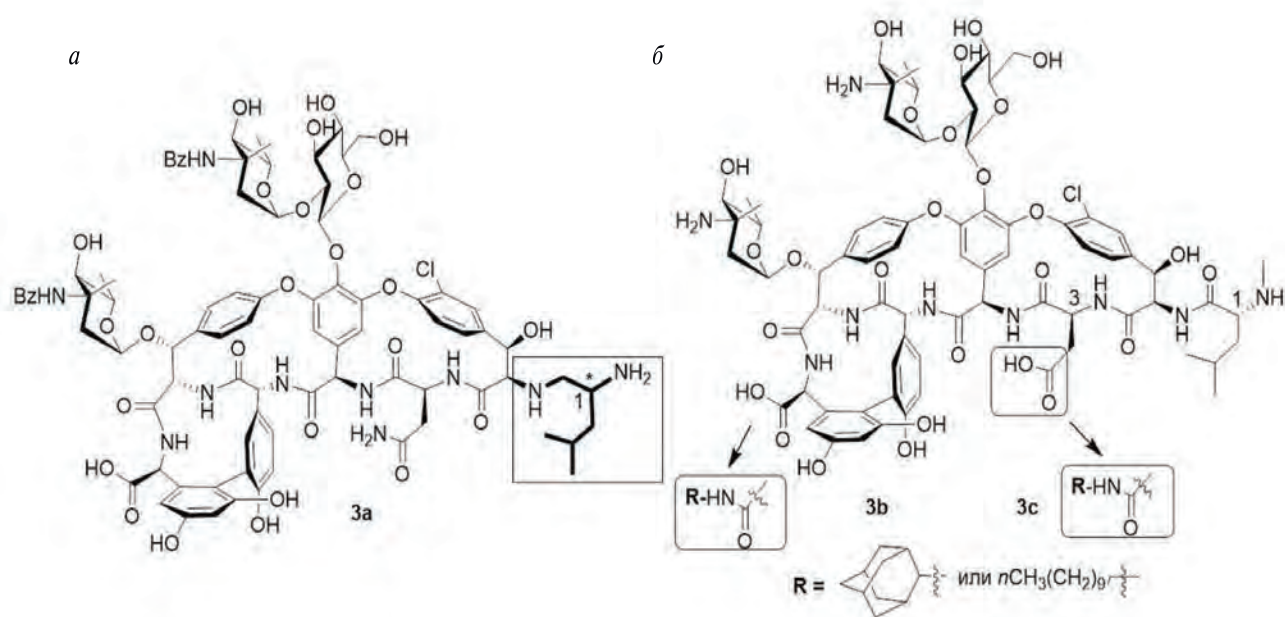


Рис. 5. Структуры производных эремомицина (3а-с), модифицированных по АК1 (а) и по АК1 и АК3 (б). Bz – бензил.

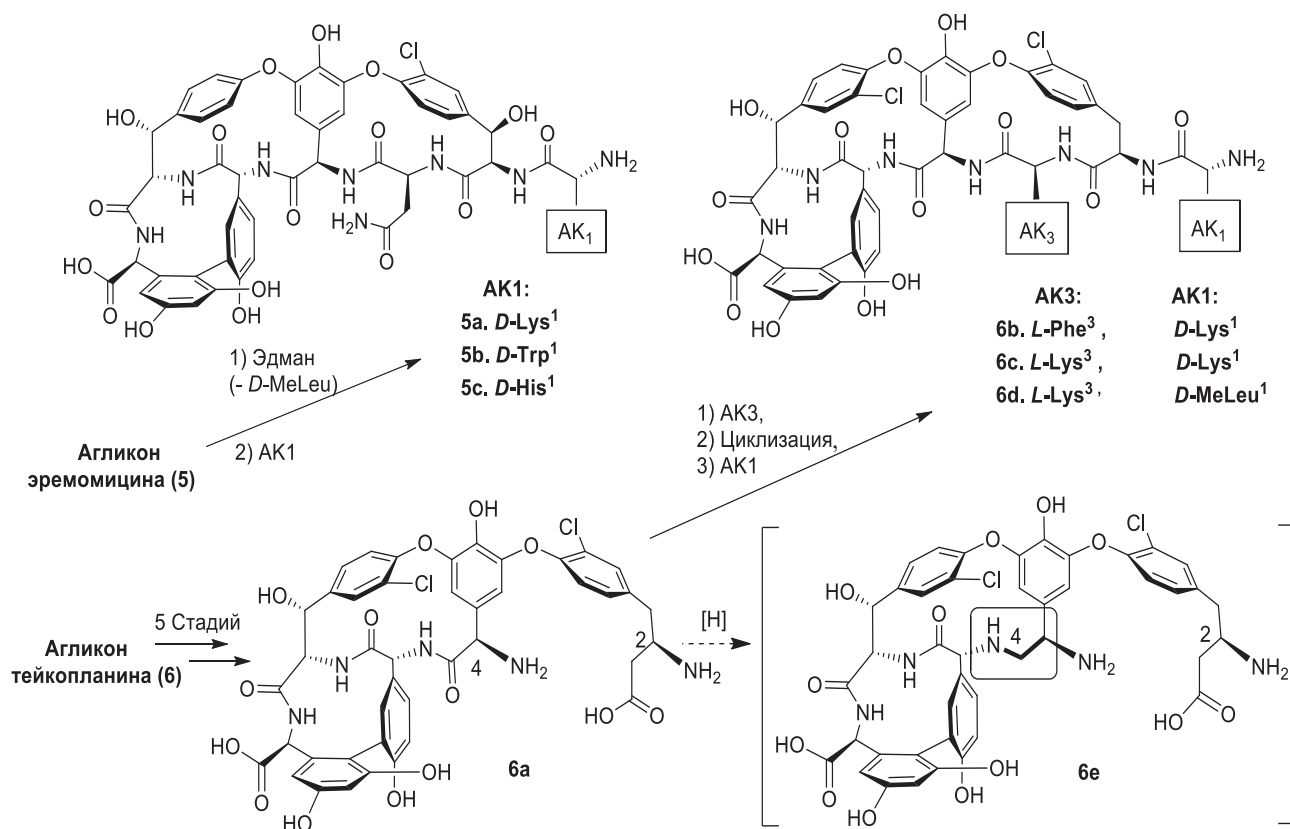


Рис. 6. Превращения агликонов гликопептидов по аминокислотным остаткам АК1 и АК1/АК3 (соединения 5а-с и 6b-d) и лишенных АК1 и АК3 (соединения 6а и 6е).

В частности, агликон тейкопланина (**6**) после расщепления подвергли дальнейшей трансформации, заключающейся в последовательном одновременном удалении АК1 и АК3 двойной реакцией Эдмана, блокировании N- и C-концевых групп, окислении спиртовой группы до карбоксильной с последующим деблокированием и образованием промежуточного трипептида (**6a**) (пять стадий синтеза). Далее путем последовательного введения соответствующей АК3, циклизации до макроцикла с образованием промежуточного гексапептида с последующим присоединением АК1 из (**6a**) были получены новые гептапептиды (**6b–d**).

Такая модификация-реконструкция гликопептида по АК1 и АК3 хотя и дала положительные результаты, но не привела к решающему прорыву в преодолении резистентности энтерококков VanA. Однако проведенные исследования дали импульс для дизайна и синтеза следующего поколения гликопептидов с принципиально новой конструкцией связывающего кармана, в котором отсутствует отталкивание двух атомов кислорода.

В частности, благодаря промежуточному трипептиду (**6a**) в приведенном синтезе [29] открылась возможность химическим путем восстановить критически важную NHCO-группу АК4–АК5 до аминотиленовой NH_2CH_2 с образованием (**6e**). А на основе (**6e**) по уже отработанным схемам синтеза можно создать псевдогептапептид, который за счет нивелирования отталкивания атомов кислорода антибиотика и лиганда теоретически мог более прочно связаться с остатком *D*-Ala-*D*-Lac.

Эта идея была реализована группой ученых под руководством Roger D.L., создавших “SUPER DRUGS” [30].

Основой такой возможности стала проведенная в 1998–1999 гг. тремя коллективами синтетиков под руководством Evans D.A., Nicolaou K.C. и Roger D.L. титаническая работа по получению природных гликопептидов, включая ванкомицин (**1**), эремомицин (**3**) и другие гликопептиды этого класса, причем учеными последней группы предложен ряд усовершенствований, в результате которых синтез (**1**) был выполнен с общим выходом 3.7% [31].

Для создания антибиотиков третьего поколения “SUPER DRUGS” предварительно синтезировали ключевое соединение – 4,5-тиоаналог агликона ванкомицина (**7a**) (рис. 7), из которого реакциями восстановления и соответственно аминирования были получены целевые $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ и NH(C=NH)- производные агликона ванкомицина (**7b**) и (**7c**) (рис. 8) [32, 33]. Соот-

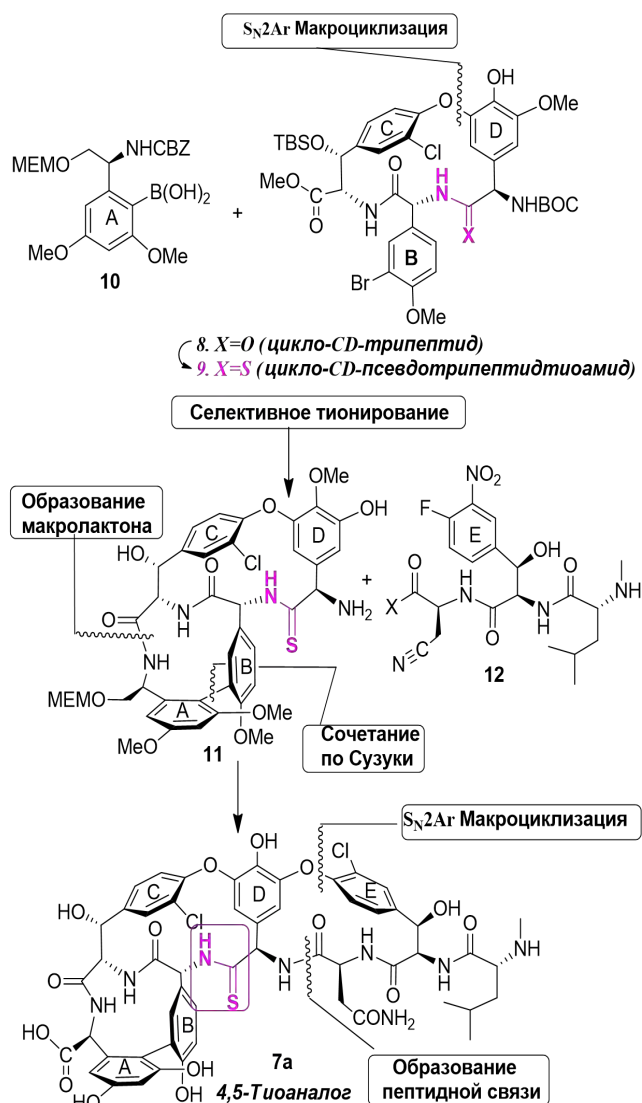


Рис. 7. Сокращенная схема получения ключевого промежуточного 4,5-тиоаналога агликона ванкомицина (**7a**).

ветственно промежуточный (**7a**) получили в результате многоступенчатого синтеза по методикам, аналогичным разработанным ранее для синтеза агликона ванкомицина (**4**). При этом полициклическую структуру получали с помощью последовательных реакций, причем тиогруппу вводили на ранних стадиях синтеза. Сначала из цикло-CD-трипептида (**8**) тионированием амидной связи был получен цикло-CD-псевдо-трипептидтиоамид (**9**) (система CBD), который, в свою очередь, в реакции с производным борновой кислоты (**10**) (кольцо А) с последующими реакциями макролактонизации и сочетания по Сузуки обеспечил образование двух соединенных макроколец системы ABCD (**11**). Далее к полу-

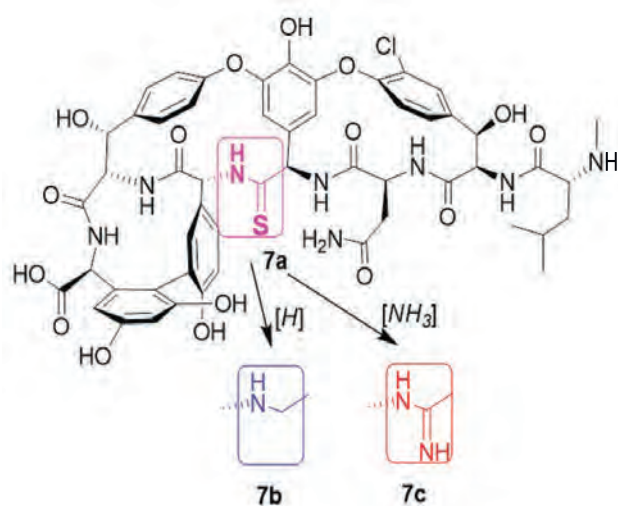


Рис. 8. Структуры 4,5-тиоаналога агликона ванкомицина (7a) и, соответственно, его аминотилеино ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) и амидинопроизводных (NH(C=NH)-) (7b, 7c).

ченному 4,5-тиоамидтетрапептиду (11) присоединили N-концевой трипептид (с кольцом E) (12) с образованием пептидной связи, что и завершило получение ключевого 4,5-тиоаналога агликона ванкомицина (7a).

Установлено, что взаимодействие производного (7b) ванкомицина с измененной группой ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, АК4-АК5) с “резистентной” мишенью усилилось ($K_a = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ против $K_a \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$ для агликона ванкомицина), однако это произошло за счет ослабления взаимодействия с “чувствительной” мишенью: $K_a = 4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ против $K_a \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ для агликона ванкомицина (4). В результате значения взаимодействия (7b) как с резистентным (VanA), так и с чувствительным энтерококком (МПК = 31 мкг/мл) сравнялись, но при этом оказались ниже активности исходного антибиотика в отношении чувствительного штамма (МПК = 2 мкг/мл) [30].

Напротив, производное агликона ванкомицина (7c) с измененной амидиновой группой NH(C=NH) (АК4-АК5) показало одинаковое сродство к обоим лигандам (a и b) ($K_a \sim 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), что в результате привело к проявлению одинаково высокой активности против VanA-резистентных бактерий *E. faecalis* VanA (МПК = 0.3–0.6 мкг/мл) (рис. 10) [30].

Совершенно ясно, что синтез “SUPER DRUGS” является большим достижением и имеет большую научную значимость. Однако метод получения (>30 стадий) остается на

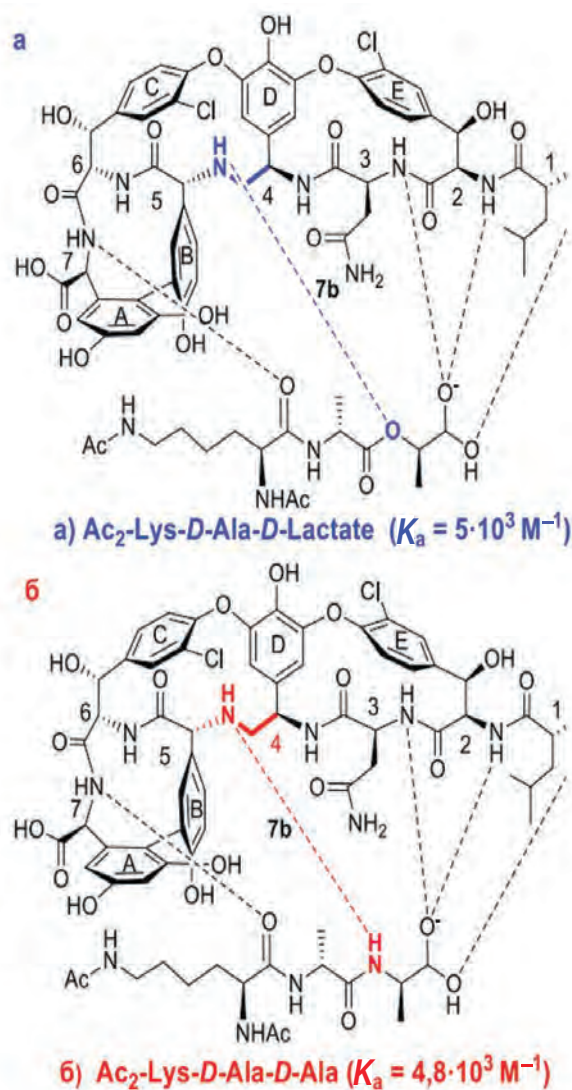


Рис. 9. Взаимодействие производного ванкомицина (7b) с депептидом $\text{Ac}_2\text{-Lys-D-Ala-D-Lac}$ ($K_a = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) (a) и с пептидом $\text{Ac}_2\text{-Lys D-Ala-D-Ala}$ ($K_a = 4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) (б).

данный момент очень дорогим. Гораздо более простым и менее затратным подходом оказалась направленная химическая трансформация природных гликопептидных антибиотиков, в результате которой удалось получить аналоги с дополнительным механизмом действия, обеспечивающим возможность преодоления бактериальной резистентности. С помощью химической трансформации природных антибиотиков (одна–три стадии синтеза) на основе ванкомицина (1), тейкопланина (2), эремомицина (A40926A) (3) и хлорэремомицина (A82846B) (13) получены серии аналогов, преодолевающие резистентность бактерий, антибиотики второго поколения, в том числе оритавадин (“Eli Lilly”, США), телавандин (“Theravance”,

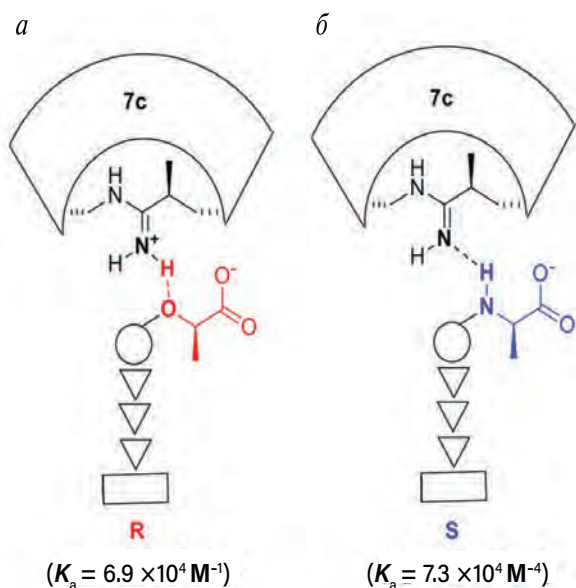


Рис. 10. Модель взаимодействия производного ванкомицина (7с) с депсипептидом Ac₂-Lys-D-Ala-D-Lac ($K_a = 6.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (а) и пептидом Ac₂-Lys-D-Ala-D-Ala ($K_a = 7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (б).

США) и далбаванцин (“Vicuron Pharm.”, ранее “LePetit”, Италия). Препараты нового поколения одобрены FDA (США) в 2013–2014 гг. для лечения инфекций, вызванных грамположительными патогенными бактериями, включая штаммы гликопептидрезистентных энтерококков и стафилококков [10, 22].

Обнадеживающие результаты получены при использовании уже первых модификаций эре-

момицина (3) и хлорэремомицина (13), полученных путем восстановительного алкилирования альдегидами N’H₂-группы (R¹) при АК4 и ацилирования NMe-группы АК1 (R²) (с ацил-Cl, соединения 3а и 3б) [34].

Практически одновременно на основе хлорэремомицина (13) фирмой “Eli Lilly” был независимо получен высокоактивный *n*-Cl-Ph-*n*-Bz-хлорэремомицин (оритаванцин) (13а) (рис. 11) [35–37]. Этот препарат, одобренный FDA в 2014 г., активен в отношении резистентных штаммов энтерококков VanA и VanB и применяется в настоящее время при острых бактериальных инфекциях кожи и ее придатков.

Успешным направлением модификации ванкомицина (1) и эремомицина (3) стало избирательное аминокислотное ацилирование той же функциональной группы N’H₂-аминосахара при АК4 активированными OSu-эфирами замещенных аминокислот. Среди производных этого типа наиболее активным (МПК = 2–4 мкг/мл) в отношении резистентных штаммов энтерококков VanA оказался аналог ванкомицина (1а), содержащий по N’-аминогруппе ванкозамина остаток *n*-O-(*n*-Octyl)-*n*-Ph-Gly (рис. 12) [38].

Интересно отметить, что полусинтетическое производное природного гликопептида, родственного тейкопланину A40926A, ацилированное жирной кислотой по АК48, – далбаванцин (14), также применяется для лечения пациентов с ABSSSI, вызванными большинством чувствительных штаммов грамположительных микроорганизмов и некоторых штаммов резистентных энтерококков. Далбаванцин (14), как и 2, акти-

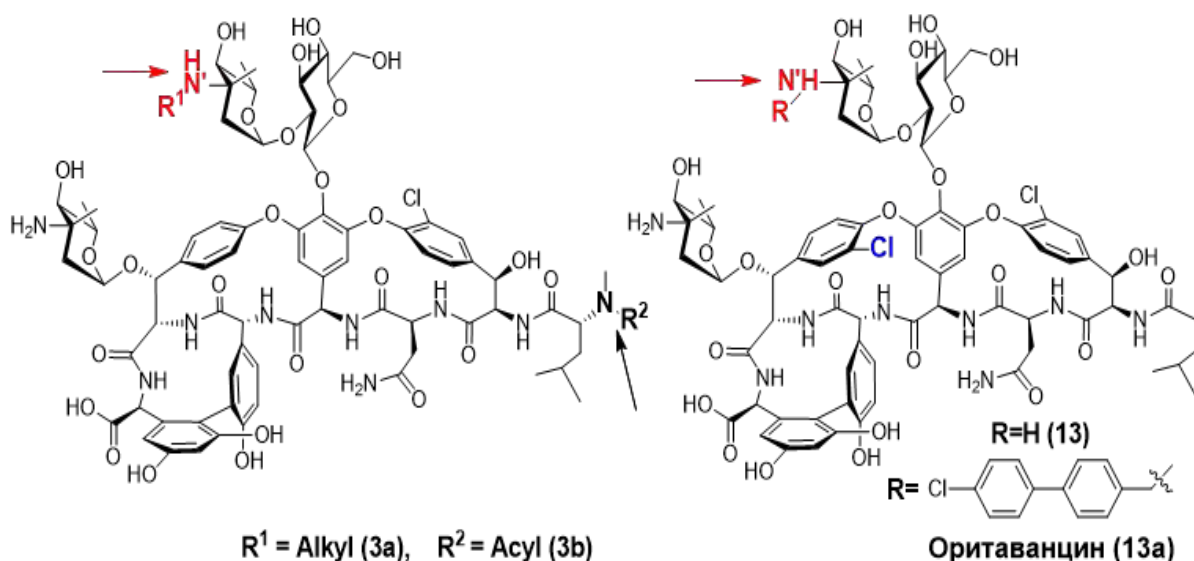


Рис. 11. Структуры производных эремомицина (3а, 3б), хлорэремомицина (13) и его производного оритаванцина (13а).

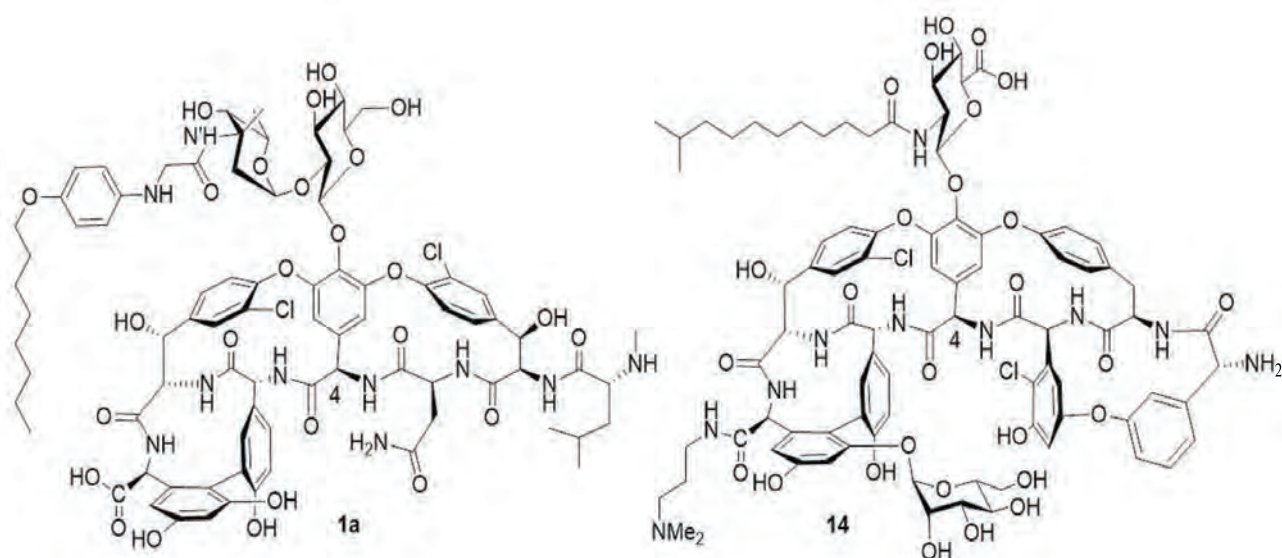


Рис. 12. Структуры N' -ацильных производных ванкомицина (**1a**) и далбаванцина (**14**).

вен в отношении резистентных энтерококков VanB, но не действует на VanA. Далбаванцин (**14**) имеет увеличенный период полувыведения – 204 ч, что позволяет вводить этот препарат однократно [39]. Интересно, что название **14** происходит от “dalbaheptides” – *D*-Ala-*D*-Ala-Binding Hepta Peptides [40], однако оно не прижилось.

Далбаванцин (**14**) является N^1 , N^1 -диметиламинопропиламидом природного антибиотика A40926A. Этот гидрофильный радикал делает антибиотик хорошо растворимым в водных растворах, поскольку компенсирует его гидро-

фобность за счет остатка жирной кислоты [41]. Принцип амфифильности реализован также при создании еще одного важного препарата N' -*n*-дециламиноэтил-7d-аминометилфосфоната ванкомицина – телаванцина (**1b**) (TD-6424), который содержит гидрофобный фрагмент, присоединенный к N' -аминогруппе ванкозамина при АК4, и гидрофильный фрагмент в положении 7d бокового ароматического радикала АК7.

Получение данного препарата стало возможным благодаря разработанному ранее в Институте оригинальному способу введения

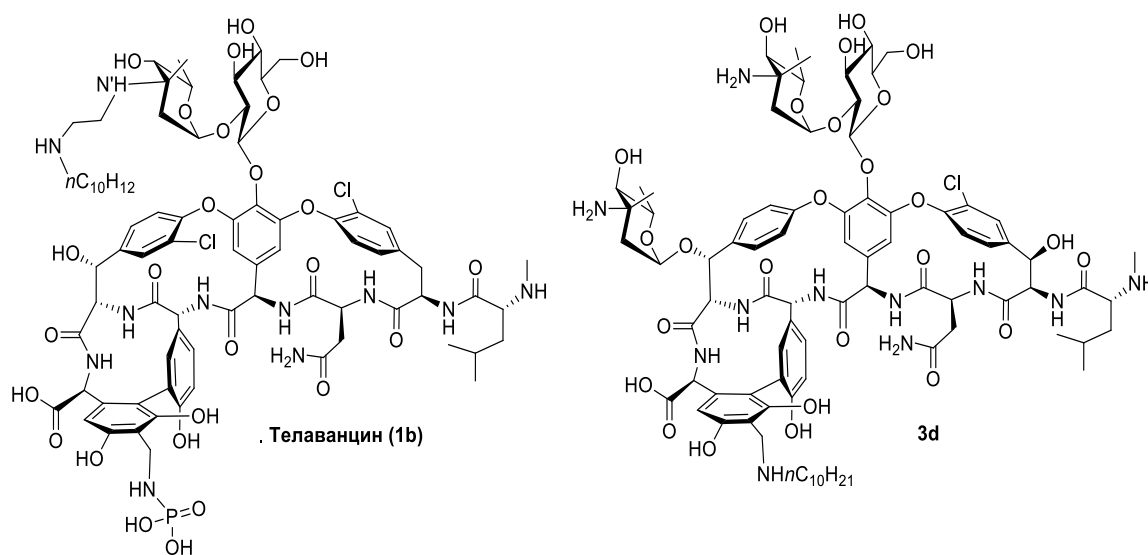


Рис. 13. Структуры производных типа основания Манниха – телаванцина (**1b**) и эремомицина (**3d**).

радикалов разной амфифильности в ароматическое кольцо АК7 гликопептидов по реакции Манниха [42]. На примере производных Манниха четко показано, что оптимальный размер гидрофобного радикала имеет С9–С12, это правило подтверждено многочисленными примерами, включая вышеприведенные соединения **1a**, **3b–d**, **13a**, **14**. Среди полученных производных наибольшей активностью в отношении чувствительных энтерококков (МПК = 0.5 мкг/мл) и устойчивых энтерококков VanA (МПК = 2–8 мкг/мл) обладало соединение (**3d**) с радикалом R = $-\text{NHC}_{10}\text{H}_{21}$ (рис. 13, 14, табл. 1).

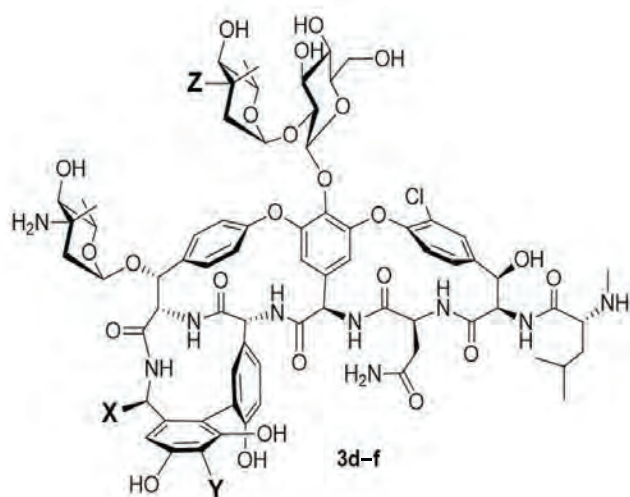


Рис. 14. Формула соединений (**3d–f**), приведенных в табл. 1.

Результаты проведенных исследований позволили сделать еще два важных вывода: 1) аналоги гликопептидных антибиотиков, содержащие дополнительные радикалы ~ С9–С16 арильного или алкильного типов, способны преодолевать резистентность грамположитель-

ных бактерий; 2) положение заместителя практически не имеет значения (рис. 14, табл. 1), хотя ранее считали, что гидрофобный радикал желательно вводить в дисахаридный фрагмент при АК4 по аналогии со структурой тейкопланина (**2**), имеющего гидрофобный заместитель в том же положении АК4 [22].

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГЛИКОПЕПТИДОВ

Полученные результаты подтверждены также при изучении влияния места введения радикалов жирных кислот разной длины (С6–С18) по трем функциональным группам ванкомицина: N'-H₂-дисахарида при АК4, N- и С-концевым остаткам пептидного кора при АК1 и АК7 соответственно. Все три производных показали наиболее высокую антимикробную активность в отношении ванкомицинрезистентных энтерококков VanA, VanB и VanC (МПК ~ 2–4 мкг/мл) с заместителем размером С10–С12 независимо от его положения на периферии молекулы [43].

Предполагалось, что согласно теории, предложенной группой исследователей под руководством Williams D.H., такой гидрофобный заместитель способствует возможности закоривания производного антибиотика в мембране [44]. Однако механизмы действия гидрофобных гликопептидов оказались значительно сложнее (см. ниже).

Наиболее эффективным методом введения различных заместителей в молекулу гликопептидных антибиотиков является амидирование концевой карбоксильной группы с помощью реагентов типа РувОР. Реакции амидирования протекают при комнатной температуре с высокими выходами и не требуют предварительной защиты других функциональных групп.

В Институте получена серия перспективных карбоксамидов эремомицина, обладающих преимуществом перед исходными антибиотиками. В частности, адамантил-2-амид эремомицина (**3g**) (рис. 15) проявлял активность

Таблица 1. Антибактериальная активность производных эремомицина, модифицированных по различным положениям на периферии молекулы

Тип соединения	Соединение	МПК, мкг/мл		
		MRSA	GSE	GRE (VanA)
Основание Манниха (3d)	Y = $-\text{CH}_2\text{NHC}_{10}\text{H}_{21}$	0.5–1	0.5	2–8
Амид (3e)	X = $-\text{CONHC}_{10}\text{H}_{21}$	0.25–0.5	0.25–0.5	8
N'-H-производное по сахару (3f)	Z = $-\text{N}'\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{21}$	0.5–1	0.25–0.5	4–8

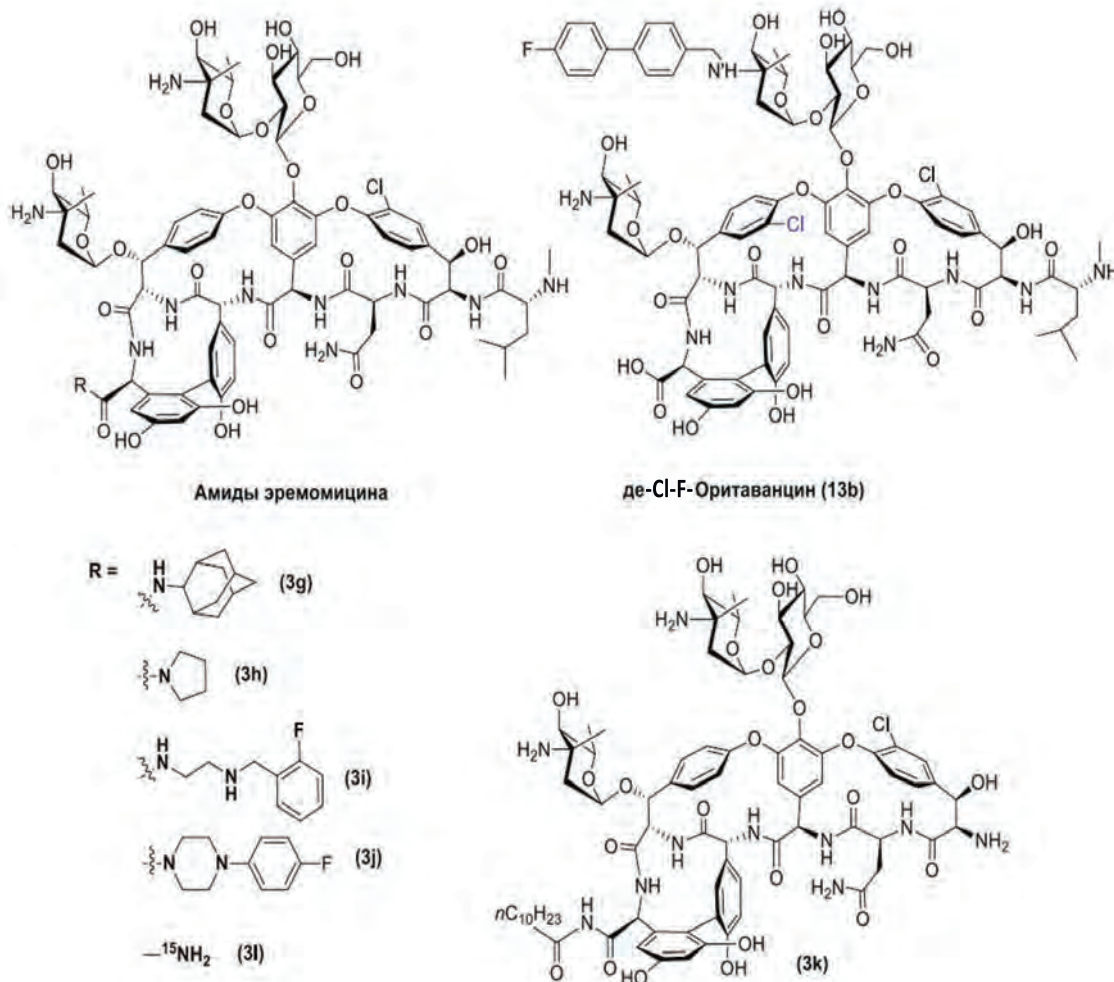


Рис. 15. Структуры карбоксимидных аналогов эремомицина (3g–3m) и де-Cl-F-оритаванцина (13b).

в отношении штаммов MSSA, MRSA, VISA, VRE, а также *Bacillus anthracis*, включая штаммы, устойчивые к ципрофлоксацину. В модельных опытах *in vivo* он лучше защищал животных, искусственно зараженных стафилококком или возбудителем сибирской язвы, от гибели, чем ципрофлоксацин [45].

Два других производных – пирролидид (3h) [46] и 2-фторбензиламиноэтиламид эремомицина (флаванцин) (3i) [47, 48] (рис. 15) – показали высокую активность *in vitro* в отношении штаммов MSSA, MRSA, энтерококков VanA (МПК = 1–4 мкг/мл) и стафилококков VISA (МПК = 0.5–1 мкг/мл). В доклинических испытаниях на животных амиды (3h) и (3i) имели явные преимущества перед применяемыми в клинике аналогами и, что очень важно, реже приводили к развитию аллергических реакций. Как препараты нового поколения они перспективны для продвижения в клинику.

При обсуждении рассмотренных примеров возникает вопрос о механизмах антибактериальной активности, поскольку модификации второго типа, не затрагивающие функциональные группы в связывающем кармане, тем не менее привели к появлению активности в отношении резистентных энтерококков с измененной мишенью. Этот факт имеет несколько объяснений.

С целью углубленного изучения механизма действия гидрофобных производных гликопептидов проведены серии экспериментов на модельном штамме *Escherichia coli* OV58 (pTA9), у которого отсутствует наружная оболочка и разделены стадии трансгликозилирования (сшивание димерных пептидильгликозидных фрагментов с образованием незрелого линейного пептидогликана) и транспептидации (сшивание цепей незрелого пептидогликана до трехмерной структуры) [49].

Для построения незрелого линейного пептидогликана использовали его предшественники – дисахаридпептиды, содержащие в одном случае *D*-Ala-*D*-Ala (т.е. нормальные, полноценные мономеры), а в другом, укороченные пептиды с одним остатком *D*-Ala (т.е. неполноценные мономеры). Показано, что ванкомицин (**1**) или эремомицин (**3**) ингибирует стадию трансгликозилирования только при использовании нормальных мономерных предшественников, при этом в случае неполноценных мономеров ингибирования не происходит, поскольку антибиотик не может связаться с поврежденной мишенью. Совсем иная ситуация наблюдается при ингибировании получения незрелого пептидогликана с помощью гидрофобного производного гликопептида с “разрушенным карманом” (например, *n*-дециламида де-*D*-MeLeu-эремомицина (**3k**)). Оказалось, что в присутствии **3k** стадия трансгликозилирования нарушается практически одинаково при использовании и неполноценных, и нормальных мономеров. Это говорит о том, что в присутствии гидрофобного антибиотика трансгликозилаза фактически не нуждается во взаимодействии с концевым пептидом *D*-Ala-*D*-Ala.

Полученные результаты подтверждены экспериментами по изучению антибактериальной активности гидрофобных производных гликопептидов. Например, производное с разрушенным связывающим карманом **3k** проявляло активность в отношении как чувствительных штаммов *S. epidermidis* 533 и *S. haemolyticus* 602, *E. faecium* (GSE) 568 и *E. faecalis* (GSE) 559 (МПК = 0.5–1 мкг/мл и МПК = 2 мкг/мл соответственно), так и резистентных штаммов *E. faecium* 569 (GRE) и *E. faecalis* (GRE) 560 (МПК = 2–4 мкг/мл).

Эти результаты позволили сделать важный вывод о том, что замена мишени *D*-Ala-*D*-Ala гидрофобного гликопептида на резистентную мишень *D*-Ala-*D*-Lac не влияет на трансгликозилирование, при этом у такого производного сохраняется способность останавливать образование зрелого трехмерного пептидогликана, не связываясь априори ни с чувствительной мишенью *D*-Ala-*D*-Ala, ни с измененной *D*-Ala-*D*-Lac.

С целью более подробного изучения механизмов действия гликопептидных антибиотиков в Институте были специально синтезированы производные эремомицина, содержащие ЯМР-меченые стабильные изотопы ^{19}F и ^{15}N , и методом твердофазного ЯМР REDOR изучены комплексы полученных гликопептидов с пептидогликаном непосредственно в нативных клетках грамположительных бактерий.

Установлено, что ^{19}F -содержащее гидрофобное производное эремомицина – 1-(4-фторфенил)пиперазиниламид эремомицина (**3j**), в комплексе с интактной клеткой *S. aureus* тесно взаимодействует со вторым участком связывания – с пептидной ножкой *D*-изо-Gln-*L*-Ala (рис. 16a) [50].

Похожие результаты получены и для ^{19}F -содержащего гидрофобного производного оритаванцина – *n*-F-Ph-*n*-Bz-хлорэремомицина (**13b**) (рис. 16б). Методом REDOR обнаружено дополнительное место взаимодействия (**13b**) с поперечным пентаглициновым мостиком – (Gly)₅- [50].

В результате проведенных исследований предложены модели механизмов антибактериального действия на энтерококки VanA гликопептидов, содержащих гидрофобные заместители (**3d–3j**, а также **3l**, **13a**, **13b**), и ванкомицина (**1**) (рис. 17) [22].

Согласно этой модели, ванкомицин (**1**) связывается с концевым пептидом *D*-Ala-*D*-Ala ствлового пептида преимущественно на стадии трансгликозилирования (механизм 1, рис. 17a). В отличие от ванкомицина (**1**) такие производные (рис. 17б) ингибируют как трансгликозилирование (механизм 1), так и транспептидацию (механизм 2), а также нарушают целостность бактериальных мембран (механизм 3). Аналогичная модель механизмов действия аналогов хлорэремомицина, в частности оритаванцина (**13a**), предложена в работе [51].

Важно добавить, что положительный заряд гидрофобной части заместителя не снижает активности изученных гликопептидов, направленной против резистентных грамположительных бактерий, но в ряде случаев способствует снижению токсичности. Так, например, *N*-((1-тетрадецилпиридин-1-ийм-4-ил)метил)амид эремомицина (**3l**) (рис. 15) проявляет активность в отношении как пяти чувствительных энтерококков и *S. aureus* ATCC 29213 (МПК 0.25–2 мкг/мл), так и резистентных штаммов *E. gallinarum* 1308 и *E. faecium* 3567 (МПК = 2 мкг/мл) [52].

Аналогичный эффект наблюдали и для протонированных производных ванкомицина, содержащих гидрофобный радикал (рис. 18). Так, производное дипиколилванкомицина (**1c**) показало повышенную эффективность против бактерий, устойчивых к ванкомицину (**1**), а производное VanQAmC10 (**1d**), содержащее гидрофобный заместитель и протонированную группу, сохранило активность против бактерий, устойчивых к ванкомицину. При этом соединение (**1d**) было значительно менее токсичным как *in vitro*, так и *in vivo* [53]. Предпо-

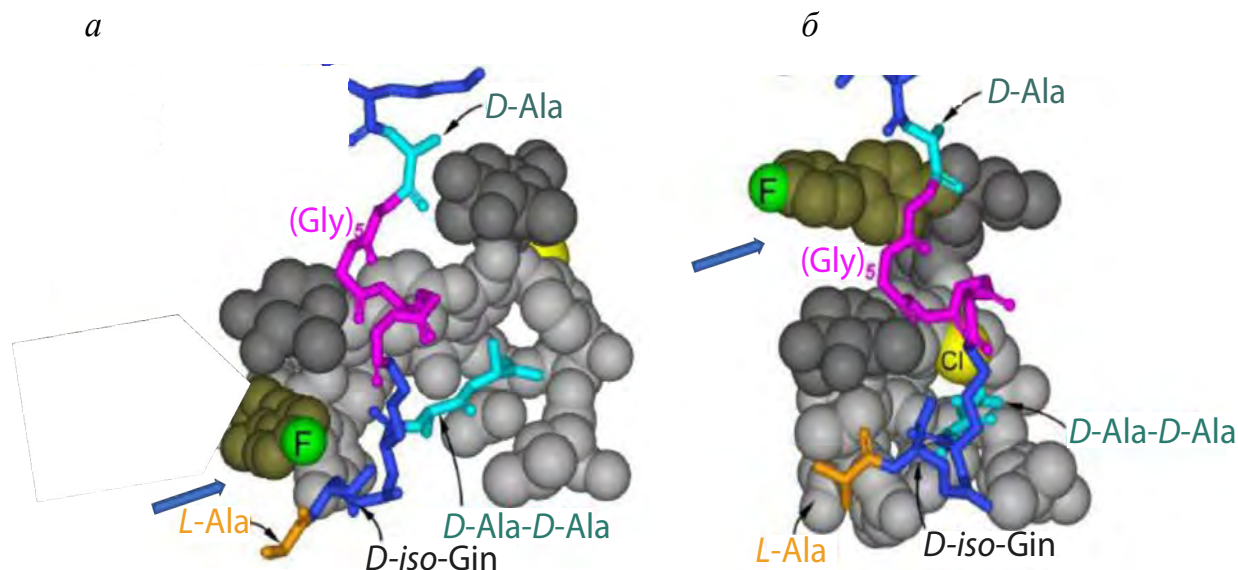


Рис. 16. Модели взаимодействия ^{19}F -содержащих аналогов эремомоцина (**3j**) (а) и хлорэремомоцина (**13b**) (б) с фрагментами пептидогликана интактной клетки *Staphylococcus aureus* с пептидной ножкой *D*-iso-Gln-*L*-Ala и, соответственно, с мостиком $-(\text{Gly})_5-$, полученные методом REDOR. Прямой синей стрелкой указаны ^{19}F -содержащие гидрофобные радикалы (выделены зеленым) антибиотиков.

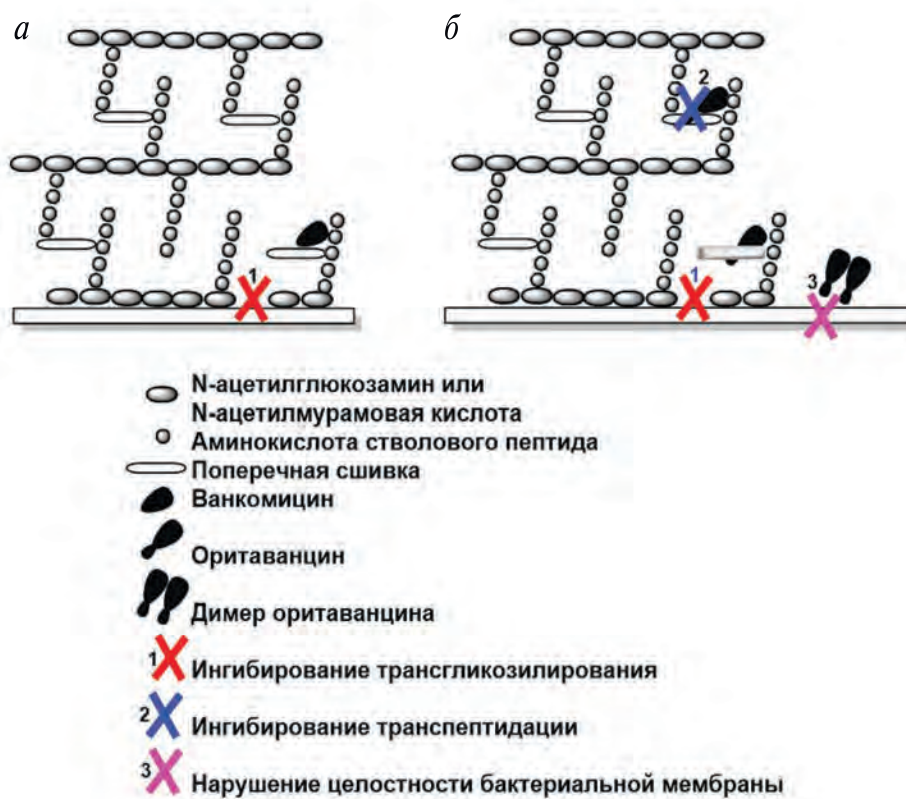


Рис. 17. Предполагаемая модель механизмов действия ванкомицина (**1**) (а) и производных гликопептидов, содержащих гидрофобный заместитель (**3d–3j**, а также **3l**, **13a**, **13b**) (б). Ингибирование ванкомицином (**1**) стадии транспептидации в случае (а) незначительно, поэтому не показано.

лагается, что при взаимодействии положительно заряженных производных с встроенными в мембрану отрицательно заряженными бактопренолпирофосфатом и ундекапренилпирофосфорил-NAG-NAM-пентапептидом (липидом II) образуется ионная связь.

В связи с предположением о возможности механизма 3 для производных (**3d–3j**, **3l**, **13a**, **13b**) необходимо более подробно рассмотреть способность некоторых гликопептидов образовывать го-

и менее стабильным комплексом с модельной мишенью Ac₂-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala ($K_a \sim 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) у (**3**) в сравнении с (**1**) ($K_a \sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Была сделана попытка объяснить этот факт тем, что димеризация молекул способствует образованию более прочного комплекса антибиотика (**3**) с лигандом Ac₂-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala [23].

Из последних данных, полученных методом ЯМР [56], также следует, что эремомицин (**3**) образует прочные димеры и олигомеры в при-

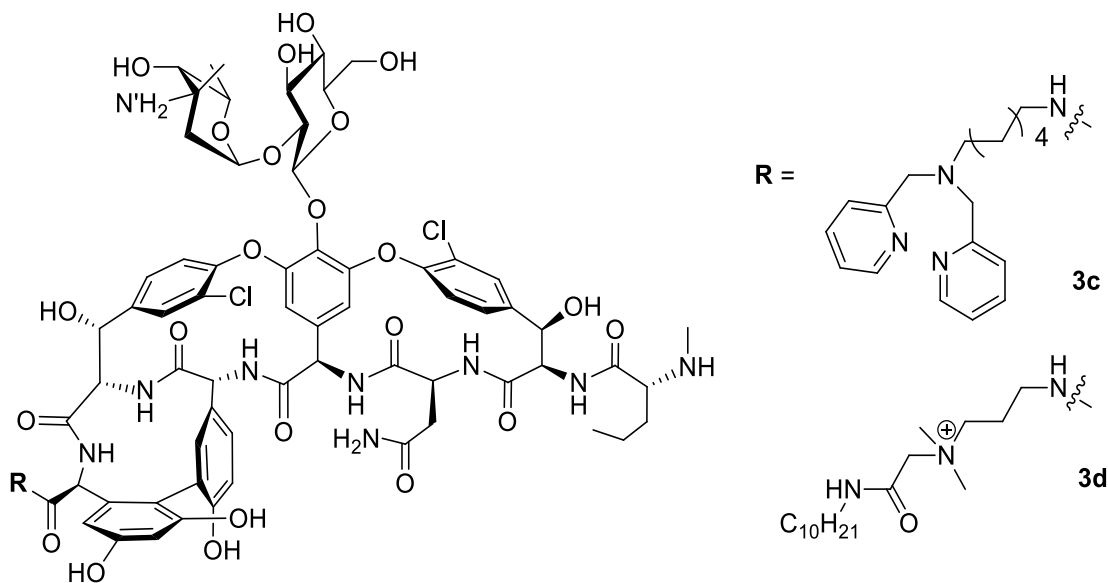


Рис. 18. Производные ванкомицина (**1c**, **1d**), содержащие гидрофобный радикал и положительно заряженную группу.

модимеры. Ванкомицин (**1**) способен в определенных условиях образовывать мономолекулярные димеры, что подтверждено методами молекулярно-динамического моделирования, основанными на ЯМР [54]. Но особенно эта способность характерна для эремомицина (**3**) и хлорэремомицина (**13**), димерный комплекс у которых дополнительно стабилизирован моносахаридным остатком эремозамина при АК6. Еще в ранних работах при изучении спектров ЯМР в водных растворах было установлено, что молекула эремомицина (**3**) существует в виде гомодимера типа голова к хвосту (рис. 19) [55]. Молекулы антибиотика удерживаются в димере за счет водородных связей, образованных “спинками” пептидных групп, не участвующих в связывании с мишенью *D*-Ala-*D*-Ala.

В этой связи следует напомнить, что еще в ранних исследованиях, проведенных методом УФ-спектроскопии, отмечали несоответствие между более высокой (в 3–5 раз) активностью эремомицина (**3**) в сравнении с ванкомицином (**1**) в отношении грамположительных бактерий,

существовании лиганда *N*-Ac₂-*D*-Ala-*D*-Ala. Олигомеризация комплекса (**3**) с лигандом приводит к усилению его антибактериальной активности в отношении *S. aureus*. Ванкомицин (**1**) такого эффекта не оказывает.

Процесс образования гликопептидами гомодимеров подробно изучен методом ЯМР группой исследователей под руководством Williams D.H. [57]. Наличие гомодимеров гликопептидных антибиотиков позже доказали, анализируя рентгеновские спектры [58] и результаты масс-спектрометрии ESI MS [59]. Оказалось, что многие полусинтетические производные эремомицина сохраняют присущую исходному антибиотику способность димеризоваться при нейтральных значениях pH [59].

Предложена модель, согласно которой гликопептиды, содержащие гидрофобный фрагмент, например, тейкопланин (**2**) по АК4, могут заякориваться этим фрагментом на мембране [44]. Предполагается также, что оритаванцин может закрепляться на клеточной мембране

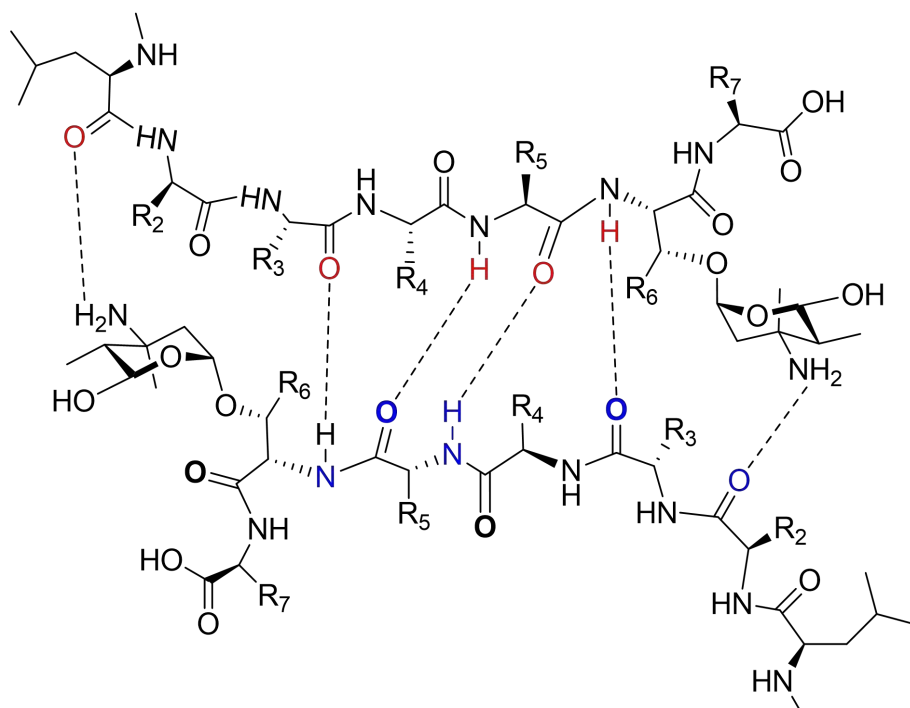


Рис. 19. Модель образования гомодимера эремомицина (3). R_1 – R_7 – боковые радикалы пептидного кора антибиотика. Пунктиром обозначены водородные связи между NH- и CO-группами пептидных цепей двух молекул антибиотика.

и самоассоциироваться в димеры, что приведет к нарушению целостности клеточной мембраны у грамположительных бактерий (рис. 17б) [51].

Интересные результаты получены при изучении упомянутым методом REDOR производного без заместителя при С-концевой группе пептидного кора – ^{15}N -амида эремомицина (3м). Обнаружено, что ^{15}N -амидная группа при АК7 этого производного сильно сблизена (3.5 Å) с остатком L -[3- ^{13}C]Ala пептидной ножки, хотя ^{15}N аспарагина АК3 больше удален от ^{13}C -групп обоих остатков D -Ala (5.1 и 4.8 Å) (рис. 20) [60].

Важно отметить, что это производное не активно в отношении резистентных энтерококков VanA, но проявляет достаточно высокую активность в отношении стафилококков VISA (МПК = 0.5 мкг/мл), малочувствительных к ванкомицину (1) или эремомицину (3) при средних величинах концентрации (МПК > 8 мкг/мл).

Другие рассмотренные амиды эремомицина (3е, 3г–3и) были, как и (3м), активны в отношении стафилококков VISA. Вполне вероятно, что близость С-концевого амидного фрагмента молекулы антибиотика к фрагменту пептидной ножки зрелого пептидогликана как-то влияет на проявление активности в отношении штаммов VISA.

Таким образом, с использованием 1-(4-фторфенил)пиперазиламида (3j) или ^{15}N -амида (3l), содержащих метку ^{19}F или ^{15}N , получено прямое доказательство возможности связывания антибиотика с определенными структурами пептидогликана, помимо взаимодействия с основной мишенью D -Ala- D -Ala. Этим и объясняется возможность ингибирования синтеза пептидогликана в присутствии гидрофобных производных как эремомицина, так и оритаванцина (13а), в клетках резистентных грамположительных бактерий типа VanA без взаи-

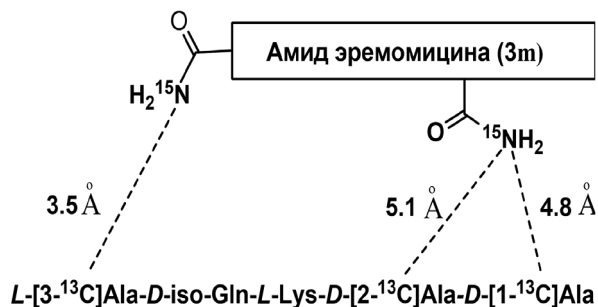


Рис. 20. Модельная схема, показывающая близость ^{15}N -амидных групп эремомицина (3м) к ^{13}C атомам пептидного фрагмента пептидогликана интактной клетки *S. aureus*, измеренную методом REDOR. Пунктиром показаны расстояния в Å.

модействия с основной мишенью, но за счет связывания с дополнительной мишенью.

В результате проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1) аналоги гликопептидных антибиотиков, содержащие дополнительные гидрофобные заместители размером $\sim C9-C16$, способны преодолеть резистентность грамположительных бактерий типа VanA, VanB;

2) место присоединения гидрофобного радикала на периферии молекулы практически не имеет значения;

3) гликопептиды, содержащие гидрофобный радикал, имеют дополнительный механизм действия; они способны связываться не только с концевым $-D-Ala-D-Ala$, но и еще с одной мишенью зрелого пептидогликана, т.е. обладают двойным механизмом действия;

4) гидрофобные производные гликопептидов с разрушенным карманом, связываются не с основной мишенью $D-Ala-D-Ala$, а с элементом структуры трехмерного пептидогликана, т.е. обладают только одним механизмом действия;

5) гликопептиды, образующие гомодимеры, также могут иметь еще один механизм действия за счет нарушения целостности бактериальных мембран.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ

Совместное изучение биологических свойств полициклических гликопептидов и их полусинтетических производных, проведенное сотрудниками Института и исследователями Rega Institute for Medical Research (Leuven, Бельгия), привело к открытию у этих соединений противовирусной активности в отношении опасных оболочечных корона- и флавивирусов, HIV-1 и -2, вируса гепатита С (HCV), цитомегаловируса (CMV), вирусов японского и клещевого энцефалита (JEV и TBEV) и DENV (лихорадка Денге), коронавирусов кошек и человека (FIPV и SARS-CoV-2) и др. [61–65]. Противовирусную активность серии производных антибиотиков группы ванкомицина–тейкопланина изучали также венгерские ученые из Университета Дебрецена [66–68].

В экспериментах на клетках, зараженных вирусами, многие производные гликопептидов имели $EC_{50} \sim 10$ мкМ и меньше при цитотоксичности в отношении клеток хозяина $CC_{50} > 80$ мкМ. Предполагалось, что механизм противовирусного действия агликонов гликопептидов связан с блокированием входа в клетку ретровируса (HIV) или

флавивируса (DENV) за счет взаимодействия с рецепторами на поверхности клетки [65].

На рис. 21 приведены примеры производных гликопептидов, наиболее интересных с практической точки зрения. Так, например, адамантил-1-метиламид агликона эремомицина (**5d**) и его аналог де-*N*-MeLeu (**5e**) ингибировали репликацию HIV-1 в микромолярных концентрациях: $EC_{50} = 1.6$ и 5.5 мкМ соответственно, при низкой токсичности $CC_{50} > 80$ мкМ в отношении лимфобластных клеток хозяина СЕМ. де-*N*-MeLeu с разрушенным связывающим карманом (**5e**) перспективен как анти-HIV-агент длительного применения, так как он не способен связываться с бактериальными мишенями и индуцировать резистентность к гликопептидам [62].

N-ВОС-адамантил-2-амид тейкопланина (**6e**) (рис. 21) ингибировал репликацию HCV ($EC_{50} \sim 3$ мкМ), но не проявлял заметной токсичности на клетках хозяина ($CC_{50} > 40$ мкМ). Совместное применение соединения (**6e**) с различными ингибиторами протеазы (VX-950) и полимеразы (2'-С-метилцитидин) HCV вызывало аддитивный эффект. Это производное тейкопланина (**6e**) эффективно очищало клетки хозяина (гепатомы) от репликонов HCV [64]. В результате оказалось, что одно и то же соединение (**6e**) может предотвращать вход вируса DENV2 в клетки BS-C-1 и ингибировать репликацию HCV после проникновения в клетки Huh 913. Поэтому важно отметить, что несмотря на родство этих вирусов, а они относятся к одному семейству Flaviviridae, противовирусная активность (**6e**) не предполагает одинакового механизма действия. Обнаружено, что производные агликона тейкопланина (**6f–h**) проявляют достаточно высокую активность ($EC_{50} \sim 7.3–8.0$ мкМ) в отношении вируса SARS-CoV-2 (штамм Frankfurt 1) при низкой токсичности в отношении клеток Vero ($CC_{50} > 80$ мкМ).

Детальный механизм противовирусной активности гликопептидов остается практически неизученным. В Институте совместно с сотрудниками Университета Падуи (Италия) и группы MHG Kubbutat's research ("ProQinase GmbH", Германия) предпринято изучение протеинкиназной активности серии производных гликопептидов [69].

Впервые обнаружена ингибирующая активность полициклических пептидов, в частности, производных гликопептидных антибиотиков тейкопланина и эремомицина, против панели из 12 рекомбинантных протеинкиназ человека и двух протеинкиназ (СК1 и СК2) печени крыс. Например, **5d**, **6e**, **6f** (рис. 21) ингибировали различные протеинкиназы со значениями $IC_{50} \leq 10$ мкМ и в концентрации 10 мкМ подавляли активность фермента более чем на 90%. Анализ кинетики

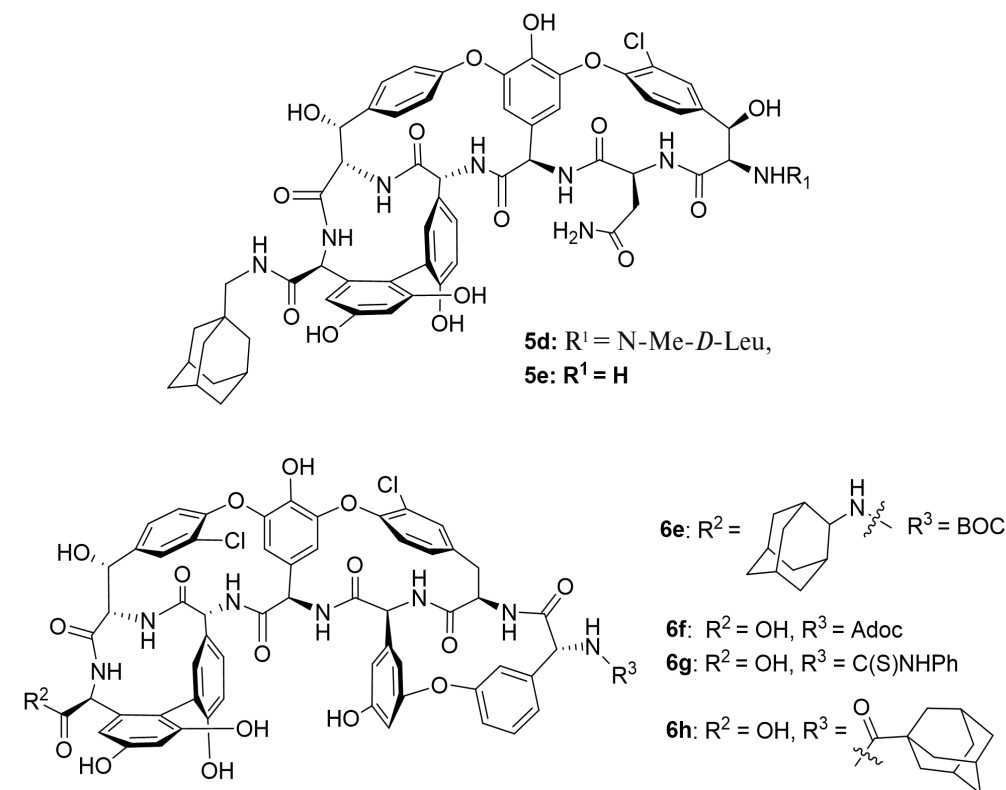


Рис. 21. Производные агликонов эремомицина (**5d**, **e**) и тейкопланина **6e–h**, обладающие противовирусной активностью, и **5d**, **6f–h**, подавляющие киназную активность.

ингибирования протеинкиназы $CK2\alpha$ аналогом агликона тейкопланина (**6f**) обнаружил редкий пример неконкурентного механизма ингибирования (по отношению к АТФ и пептидам).

Анализ полученных результатов показал, что противокиназная активность многих исследованных соединений коррелировала с их активностью против HIV, HCV, DENV2 и других оболочечных вирусов и флавивирусов.

В последние годы в связи с пандемией COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, возобновился интерес к группе гликопептидных препаратов. В этих работах особое внимание уделено тейкопланину (**2**), поскольку известно, что он и его производные, в отличие от ванкомицина (**1**) и эремомицина (**3**), не только обладают высокой антибактериальной активностью, но и проявляют противовирусную активность в отношении ряда оболочечных вирусов [61–63]. Так, например, величина EC_{50} (**2**) в отношении HIV-1 составляет 17 ± 3.5 мкМ при цитотоксической активности $CC_{50} > 100$ мкМ в клетках С3Н/3Т3.

Как уже отмечалось, производные гликопептидных производных обладают важным свойством — способностью ингибировать проникнове-

ние оболочечных вирусов (HIV, DENV) в клетку, т.е. первую и очень важную стадию заражения.

Недавно показали, что тейкопланин (**2**) способен ингибировать проникновение вирусов Эбола и SARS-CoV-2 в клетку [8]. Эти результаты подтверждены данными о том, что (**2**) ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в концентрациях, достижимых при использовании этого антибиотика в клинике. Установлено, что (**2**) связывается с белком шипа (спайк, S) SARS-CoV-2, прерывает его взаимодействие с рецептором ACE2 и избирательно ингибирует проникновение вируса в клетку [70].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что легкие плоды открытия антибиотиков были, возможно, уже давно сорваны, разумные полусинтетические модификации гликопептидов по-прежнему имеют большие перспективы для дальнейшей оптимизации и расширения клинической значимости этого важного класса гликопептидов как антибактериальных средств.

Один из источников получения новых структур антибиотиков этого класса — геномные дан-

ные о генах, вовлеченных в биосинтез полициклических гликопептидов [68, 69]. В частности, в качестве примера приведены первые результаты получения новых структур – палеомицина и корбомицина – близких аналогов природных антибиотиков группы кистамицина–комплестатина. Антибиотики этой группы представляют собой соединения, родственные полициклическим гликопептидам, но лишенные углеводных остатков, они рассматриваются как структурные архетипы известных полициклических гликопептидов, которые могут дать новые исходные соединения “Scaffolds” для последующей химической трансформации с возможностью преодоления бактериальной антибиотикорезистентности. Перспективы антибиотиков группы кистамицина–комплестатина, как основы для создания антимикробных препаратов нового поколения, рассмотрены в обзоре [70].

Полициклические гликопептиды априори не действуют на грамотрицательные бактерии, вызывающие инфекционные заболевания, не поддающиеся лечению всеми доступными средствами. Они, как и грамположительные бактерии, имеют внутреннюю оболочку, построенную из трехмерного пептидогликана и на них, в принципе, могут подействовать полициклические гликопептиды, если удастся преодолеть наружную мембрану, состоящую преимущественно из липополисахаридов и фосфолипидов.

Описаны попытки сделать полициклические гликопептиды активными в отношении грамотрицательных бактерий [13, 53, 71–76]. Молекулы ванкомицина (**1**) конъюгировали либо с сидерофорами [13, 71], либо с постоянно положительно заряженными заместителями, либо с функциональными группами, положительно заряженными при физиологических значениях pH [13, 53, 72–76]. Сидерофоры можно использовать как модераторы железозависимых процессов активного транспорта для доставки антибиотиков, особенно в грамотрицательные бактерии, а положительно заряженные группы могут облегчить проникновение антибиотиков через наружную мембрану.

И действительно, в этом направлении достигнуты определенные успехи. В опытах *in vitro* и в некоторых случаях *in vivo* получены предварительные данные об активности производных ванкомицина в отношении некоторых клинически значимых грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Важно отметить, что производные ванкомицина такого типа в отличие от самого ванкомицина (**1**) показали способность к разрушению биопленок, образованных в экспериментах *in vitro* как грамположительными (MRSA), так и грамотрицательными бактериями. Например, произ-

водное ванкомицина VanQAmC10 (**1d**) снижало жизнеспособность клеток *A. baumannii* в стационарной фазе [53].

В результате было установлено, что такие соединения в отличие от ванкомицина (**1**) и других гликопептидов второго поколения способны проникать через внешнюю мембрану и достигать своей периплазматической мишени. Следовательно, конъюгирование сидерофоров или катионных групп с гликопептидами является жизнеспособной стратегией, позволяющей сделать грамотрицательные штаммы более чувствительными к этому классу антибиотиков, хотя значения МПК обычно остаются в “промежуточном диапазоне активности” [13]. Возникают также вопросы к истинному механизму такого действия на грамотрицательные бактерии, поскольку гликопептидные производные, содержащие положительно заряженные радикалы, проявляют активность благодаря способности к самопрототированию проникновения через внешнюю мембрану. Экспериментально показано, что добавление ионов магния резко снижает активность производных типа (**1d**) в отношении грамотрицательных бактерий [72, 75, 76].

Другим направлением в создании производных гликопептидных антибиотиков нового поколения, преодолевающих все более возрастающую резистентность грамположительных бактерий, может быть создание гибридных структур двойного действия, например, состоящих из антибиотиков, обладающих различными механизмами действия [77, 78]. Проведенные исследования показали, что перспективно получение гибридных антибиотиков, состоящих, например, из ванкомицина (**1**) или эремомицина (**3**), ковалентно связанных с антибиотиками, обладающими иными механизмами действия.

Синтезированные гетеродимеры ванкомицина с цефалоспорином (цефилаванцин, TD-1792) (**1c**) [79], а также эремомицина с азитромицином (**3n**) [80] или с 3, 6'-ди-Bz-оксикарбонилканамицином А (**3o**) (рис. 22) [81] продемонстрировали высокую активность в отношении как чувствительных, так и резистентных штаммов грамположительных бактерий, включая клинические изоляты. TD-1792 (**1c**) с 2019 года находится в фазе III клинических испытаний [82].

Важнейшей перспективой изучения гликопептидных антибиотиков и их полусинтетических аналогов должны стать поиски новых структур как биологическими, так и химическими методами в сочетании с углубленным изучением механизмов их молекулярного действия в отношении резистентных грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также вирусов. Таким образом, можно сделать вывод о том,

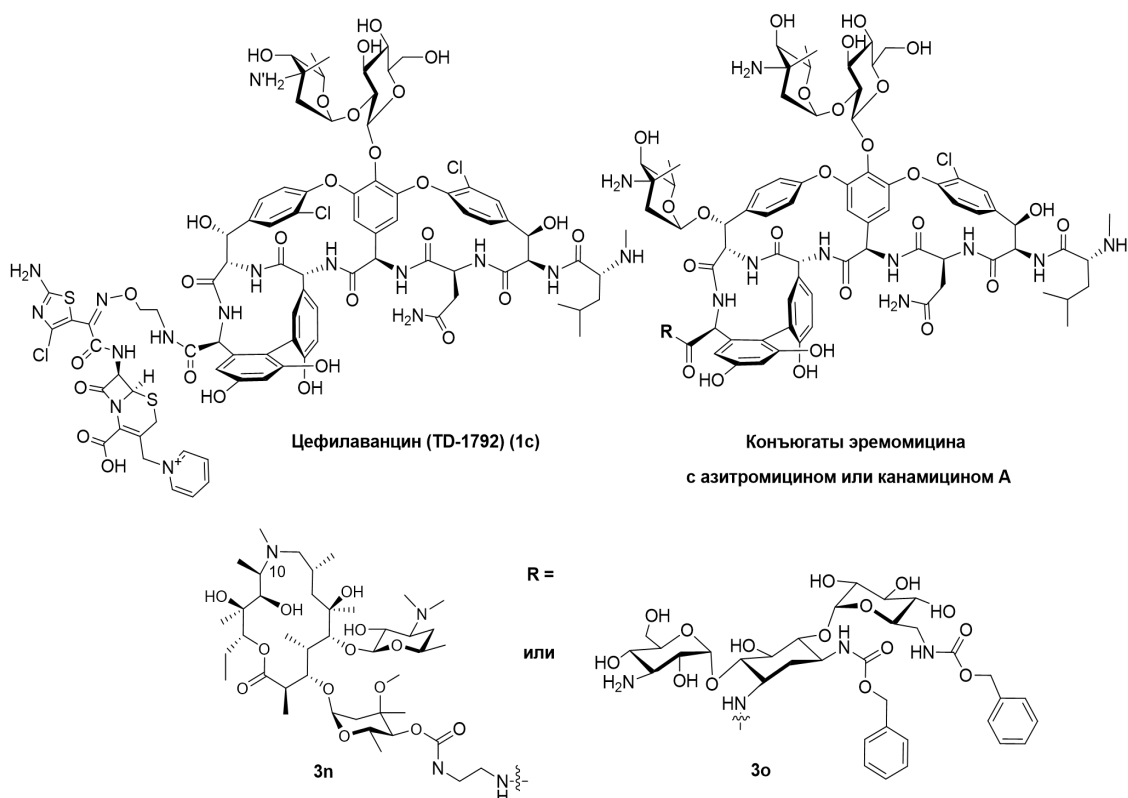


Рис. 22. Структуры цефилаванцина (1с) и конъюгатов эремомицина с азитромицином (3н) и с 3,6'-ди-Bz-окси-карбонилканамицином А (3о).

что полициклические антибиотики группы ванкомицина–тейкопланина представляют собой класс соединений, важный как для практического применения, так и для подробного изучения их влияния на микро- и макроорганизмы.

Обзор написан без привлечения дополнительного финансирования.

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World Health Organization. 10 global health issues to track in 2021. <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>
- Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. **399**, 629–655.
- Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A. (2018) Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*. **23**, 795–842.
- Олсуфьева Е.Н., Янковская В.С., Дунченко Н.И. (2022) Обзор рисков контаминации антибиотиками молочной продукции. *Антибиотики Химиотерапия*. **67**(7–8), 82–96.
- Mann A., Nehra K., Rana J.S., Dahiya T. (2021) Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2**, 100030–100043.
- Painuli S., Semwal P., Sharma R., Akash S. (2023) A new threat to the society. *Health Sci. Rep.* **6**, e1480–e1482.
- WHO Strategic Priorities on Antimicrobial Resistance Preserving antimicrobials for today and tomorrow. 18 May 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240041387>
- Mirzaei R., Campoccia D., Ravaioli S., Arciola C.R. (2024) Emerging issues and initial insights into bacterial biofilms: from orthopedic infection to metabolomics. *Antibiotics*. **13**, 184–206.
- Олсуфьева Е.Н., Янковская В.С. (2020) Основные тенденции в создании полусинтетических антибиотиков нового поколения. *Успехи Химии*. **89**(3), 339–378.
- Rubinstein E., Keynan Y. (2014) Vancomycin revisited – 60 years later. *Front. Publ. Health*. **2**, 217–223.
- Vimberg V. (2021) Teicoplanin – a new use for an old drug in the COVID-19 era? *Pharmaceuticals*. **14**, 1227–1238.

12. Гольдберг ЛЕ., Степанова Е.С., Вертоградова Т.П., Шевнюк Л.А., Шепелевцева Н.Г. (1987) Доклинические токсикологические исследования нового антибиотика эремомицина I. Острая токсичность на лабораторных животных. *Антибиотики и мед. биотехнол.* **32**, 910–915.
13. Van Groesen E., Innocenti P., Martin N.I. (2022) Recent advances in the development of semisynthetic glycopeptide antibiotics: 2014–2022. *ACS Infect. Dis.* **8**, 1381–1407.
14. Zamone W., Prado I.R.S., Balbi A.L., Ponce D. (2019) Vancomycin dosing, monitoring and toxicity: critical review of the clinical practice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **46**, 292–301.
15. Li G., Walker M.J., De Oliveira D.M.P. (2023) Vancomycin resistance in *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms.* **11**, 24–74.
16. Walsh C., Wenczewicz T. (2016) Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. Washington: ASM Press, 477 p.
17. Bugg T.D.H., Wright G.D., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P., Walsh C.T. (1991) Molecular basis of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry.* **30**, 10408–10415.
18. Healy V.L., Lessard I.A.D., Roper D.I., Knox J.R., Walsh C.T. (2000) Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-Ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chem. Biol.* **7**, R109–R119.
19. Hughes C.S., Longo E., Phillips-Jones M.K., Hussain R. (2017) Characterisation of the selective binding of antibiotics vancomycin and teicoplanin by the VanS receptor regulating type A vancomycin resistance in the enterococci. *Biochim. Biophys. Acta.* **1861**, 1951–1959.
20. Vimberg V., Cavanagh J.P., Benada O., Kofronova O., Hjerde E., Zieglerova L., Balikova Novotna G. (2018) Teicoplanin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* is associated with mutations in histidine kinases VraS and WalK. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **90**, 233–240.
21. Cong Y., Yang S., Rao X. (2020) Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of case updating and clinical features. *J. Adv. Res.* **21**, 169–176.
22. Olsufyeva E.N., Tevyashova A.N. (2017) Synthesis, properties, and mechanism of action of new generation of polycyclic glycopeptide antibiotics. *Curr. Top. Med. Chem.* **17**, 2166–2198.
23. Good V.M., Gwinn M.N., Knowles D.J.C. (1990) MM45289, a potent glycopeptide antibiotic which interacts weakly with diacetyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine. *J. Antibiotics.* **43**, 550–555.
24. Быков Е.Е., Мирчинк Е.П., Исакова Е.Б., Бычкова Е.Н., Олсуфьева Е.Н., Тевяшова А.Н. (2017) Изучение антибактериальной активности и энергии связывания с пептидным лигандом гибридным антибиотиков ванкомицин-азитромицин и эремомицин-азитромицин. *Антибиотики Химиотерапия.* **62**(3, 4), 10–17.
25. Olsufyeva E.N., Berdnikova T.F., Miroshnikova O.V., Reznikova M.I., Preobrazhenskaya M.N. (1999) Chemical modification of antibiotic eremomycin at the asparagin side chain. *J. Antibiot.* **52**, 319–324.
26. Miroshnikova O.V., Berdnikova T.F., Olsufyeva E.N., Pavlov A.Y., Reznikova M.I., Preobrazhenskaya M.N., Malabarba A., Ciabatti R., Colombo L. (1996) A modification of N-terminal aminoacid in the eremomycin aglycone. *J. Antibiot.* **49**, 1157–1161.
27. Malabarba A., Ciabatti R., Gerli E., Ferrari P., Colombo L., Ripamonti R., Olsufyeva E.N., Pavlov A.Y., Reznikova M.I., Lzhko E.I., Preobrazhenskaya M.N. (1997) Synthetic glycopeptides. II. Substitution of aminoacides 1 and 3 in teicoplanin aglycon. *J. Antibiot.* **50**, 70–81.
28. Malabarba A., Ciabatti R., Gerli E., Ferrari P., Colombo L., Ripamonti R., Olsufyeva E.N., Pavlov A.Y., Reznikova M.I., Lzhko E.I., Preobrazhenskaya M.N. (1997) Synthetic glycopeptides. II. Substitution of aminoacides 1 and 3 in teicoplanin aglycon. *J. Antibiot.* **50**, 70–81.
29. Malabarba A., Ciabatti R., Kettenring J., Ferrari P., Vekey K., Bellagio E., Denaro M. (1996) Structural modification of the active site in teicoplanin and related glycopeptides. Reductive hydrolysis of the 1,2- and 2,3-peptide bonds. *J. Org. Chem.* **61**, 2137–2150.
30. Okano A., Nakayama A., Wu K., Lindsey E.A., Schammel A.W., Feng Y., Collins K.C., Boger D.L. (2015) Total syntheses and initial evaluation of [Ψ[C(=S)NH]Tpg4]vancomycin, [Ψ[C(=NH)NH]Tpg4]vancomycin, [Ψ[CH2NH]Tpg4]vancomycin and their (4-chlorobiphenyl)methyl derivatives: synergistic binding pocket and peripheral modifications for the glycopeptide antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **137**(10), 3693–3704.
31. Moore M.J., Qu S., Tan C., Cai Y., Mogi Y., Keith D.J., Boger D.L. (2020) Next-generation total synthesis of vancomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **142**(37), 16039–16050.
32. Boger D.L., Kim S.H., Miyazaki S., Strittmatter H., Weng J.H., Mori Y., Rogel O., Castle S.L., McAtee J.J. (2000) Total synthesis of the teicoplanin aglycon. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7416–7417.
33. Xie J., Okano A., Pierce J.G., James R.C., Stamm S., Crane C.M., Boger D.L. (2012) Total synthesis of [Ψ[C(=S)NH]Tpg4]vancomycin aglycon, [Ψ[C(=NH)NH]Tpg4]vancomycin aglycon, and related key compounds: reengineering vancomycin for dual D-Ala-D-Ala and D-Ala-D-Lac binding. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1284–1297.
34. Олсуфьева Е.Н., Бердникова Т.Ф., Докшина Н.Ю., Ломакина Н.Н., Орлова Г.И., Малкова И.В., Прозорова И.Н. (1989) Модификация эремомицина по аминным группам. *Антибиотики Химиотерапия.* **34**, 352–358.
35. Патент US5919756 (1989) <https://patentimages.storage.googleapis.com/6e/d6/2e/3ed84141b5d27f/US5919756.pdf>
36. Cooper R.D.G., Snyder N.J., Zweifel M.J., Staszak M.A., Wilkie S.C., Nicas T.I., Mullen D.L., Butler T.F., Rodriguez M.J., Huff B.E., Thompson R.C. (1996) Reductive alkylation of glycopeptide antibiotics: synthesis and antibacterial activity. *J. Antibiot.* **49**, 575–581.

37. Allen N.E. (2010) From vancomycin to oritavancin: the discovery and development of a novel lipoglycopeptide antibiotic. *Antiinfect. Agents Med. Chem.* **9**, 23–47.
38. Plattner J.J., Chu D., Mirchink E.P., Isakova E.B., Preobrazhenskaya M.N., Olsufyeva E.N., Mirosnikova O.V., Printsevskaya S.S. (2007) N⁷-(alpha-aminoacyl)- and N⁷-alpha-(N-alkylamino)acyl derivatives of vancomycin and eremomycin. II. Antibacterial activity of N⁷-(alpha-aminoacyl)- and N⁷-alpha-(N-alkylamino)acyl derivatives of vancomycin and eremomycin. *J. Antibiot.* **60**, 245–250.
39. Werth B.J., Ashford N., Penewit K., Waalkes A., Holmes A., Ross D.H., Shen T., Hines K.M., Salipante S.J., Xu L. (2021) Dalbavancin exposure *in vitro* selects for dalbavancin-non-susceptible and vancomycin-intermediate strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 910.e1–910.e8.
40. Parenti F., Cavalleri B. (1989) Proposal to name the vancomycin-ristocetin like glycopeptides as dalbaheptides. *J. Antibiot.* **42**, 1882–1883.
41. Barber K.E., Tirmizi A., Finley R., Stover K.R. (2017) Dalbavancin use for the treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **8**, 77–79.
42. Pavlov A.Y., Lazhko E.I., Preobrazhenskaya M.N. (1996) A new type of chemical modification of glycopeptides antibiotics: aminomethylated derivatives of eremomycin and their antibacterial activity. *J. Antibiot.* **50**, 509–513.
43. Mühlberg E., Umstätter F., Domhan C., Hertlein T., Ohlsen K., Krause A., Kleist C., Beijer B., Zimmermann S., Haberkorn U., Mier W., Uhl P. (2020) Vancomycin-lipopeptide conjugates with high antimicrobial activity on vancomycin-resistant Enterococci. *Pharmaceuticals*. **13**, 110–123.
44. Beauregard D.A., Williams D.H., Gwynn M.N., Knowles D.H.C. (1995) Dimerization and membrane anchors in extracellular targeting of vancomycin group antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 781–785.
45. Maples K.R., Wheeler C., Ip E., Plattner J., Chu D., Zhang Y.K., Preobrazhenskaya M.N., Printsevskaya S.S., Solovieva S.E., Olsufyeva E.N., Heine H., Lovchik J., Lyons C.R. (2007) Novel semisynthetic derivative of antibiotic eremomycin active against drug-resistant gram-positive pathogens including *Bacillus anthracis*. *J. Med. Chem.* **50**, 3681–3685.
46. Olsufyeva E.N., Shchekotikhin A.E., Bychkova E.N., Pereverzeva E.R., Treshalin I.D., Mirchink E.P., Isakova E.B., Chernobrovkin M.G., Kozlov R.S., Dekhnich A.V., Preobrazhenskaya M.N. (2018) Eremomycin pyrrolidide: a novel semisynthetic glycopeptide with improved chemotherapeutic properties. *Drug Des. Dev. Ther.* **12**, 2875–2885.
47. Moiseenko E.I., Erdei R., Grammatikova N.E., Mirchink E.P., Isakova E.B., Pereverzeva E.R., Batta G., Shchekotikhin A.E. (2021) Aminoalkylamides of eremomycin exhibit an improved antibacterial activity. *Pharmaceuticals*. **14**, 379–390.
48. Патент РФ № 2751334, 2021. <https://patents.google.com/patent/RU2751334C1/ru>
49. Printsevskaya S.S., Pavlov A.Y., Olsufyeva E.N., Mirchink E.P., Isakova E.B., Reznikova M.I., Goldman R.C., Brandstrom A.A., Baizman E.R., Longley C.B., Sztaricskai F., Batta G., Preobrazhenskaya M.N. (2002) Synthesis and mode of action of hydrophobic derivatives of glycopeptide antibiotic eremomycin and des-(N-methyl-D-leucyl)eremomycin against glycopeptide-sensitive and resistant bacteria. *J. Med. Chem.* **45**, 1340–1347.
50. Kim S.J., Chang J., Singh M. (2015) Peptidoglycan architecture of gram-positive bacteria by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta.* **1848**, 350–362.
51. Zeng D., Debabov D., Hartsell T.L., Cano R.J., Adams S., Schuyler J.A., McMillan R., Pace J.L. (2016) Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**(12), a026989.
52. Моисеенко Е.И., Грамматикова Н.Э., Щекотихин А.Е. (2019) Пиколилами́ды эремомицина и катионные липогликопептиды на их основе: синтез и оценка антимикробных свойств. *Макрогетероциклы*. **12**(1) 98–106.
53. Acharya Y., Dhanda G., Sarkara P., Haldar J. (2022) Pursuit of next-generation glycopeptides: a journey with vancomycin. *Chem. Commun.* **58**, 1881–1897.
54. Jia Z.G., O'Mara M.L., Zuegg J., Cooper M.A., Mark A.E. (2013) Vancomycin: ligand recognition, dimerization and super-complex formation. *FEBS J.* **280**, 1294–1307.
55. Gause G.F., Brazhnikova M.G., Lomakina N.N., Berdnikova T.F., Fedorova G.B., Tokareva N.L., Borisova V.N., Batta G.Y. (1989) Eremomycin – new glycopeptide antibiotic: chemical properties and structure. *J. Antibiot.* **42**, 1790–1799.
56. Izsépi L., Erdei R., Tevyashova A.N., Grammatikova N.E., Shchekotikhin A.E., Herczegh P., Batta G. (2021) Bacterial cell wall analogue peptides control the oligomeric states and activity of the glycopeptide antibiotic eremomycin: solution NMR and antimicrobial studies. *Pharmaceuticals*. **14**, 83–96.
57. Gerhard U., Mackay J.P., Malpestone R.A., Williams D.H. (1993) The role of dimerization of vancomycin antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 232–237.
58. Nitani Y., Kikuchi T., Kakoi K., Hanamaki S., Fujisawa I., Aoki K. (2009) Crystal structures of the complexes between vancomycin and cell-wall precursor analogs. *J. Mol. Biol.* **385**, 1422–1432.
59. Миргородская О.А., Олсуфьева Е.Н., Колуме Д.Е., Йоргенсен Т.Г.Д., Роепсторф, П., Павлов А.Ю., Мирошникова О.В., Преображенская М.Н. (2000) Димеризация полусинтетических производных эремомицина, изученная методом ESI MS, и ее влияние на их антибактериальную активность. *Биоорган. химия*. **26**, 631–640.
60. Chang J., Zhou H., Preobrazhenskaya M., Tao P., Kim S.J. (2016) Correction to the carboxyl terminus of eremomycin facilitates binding to the non-D-Ala-

- D*-Ala segment of the peptidoglycan pentapeptide stem. *Biochemistry*. **55**, 3383–3391.
61. Balzarini J., Pannecouque C., De Clercq E., Pavlov A., Printsevskaya S., Mirosnikova O., Reznikova M., Preobrazhenskaya M. (2003) Antiretroviral activity of semisynthetic derivatives of glycopeptide antibiotics. *J. Med. Chem.* **46**, 2755–2764.
 62. Printsevskaya S., Solovieva S., Olsufyeva E., Mirchink E., Isakova E., De Clercq E., Balzarini J., Preobrazhenskaya M. (2005) Structure-activity relationship studies of a series of antiviral and antibacterial aglycon derivatives of the glycopeptide antibiotics vancomycin, eremomycin, and dechloroeremomycin. *J. Med. Chem.* **48**, 3885–3890.
 63. Balzarini J., Keyaerts E., Vijgen L., Egberink H., De Clercq E., Van Ranst M., Printsevskaya S., Olsufyeva E., Solovieva S., Preobrazhenskaya M. (2006) Inhibition of feline (Fipv) and human (SARS) coronavirus by semisynthetic derivatives of glycopeptide antibiotics. *Antiviral Res.* **72**, 20–33.
 64. Obeid S., Printsevskaya S., Olsufyeva E., Dallmeier K., Durantel D., Zoulim F., Preobrazhenskaya M.N., Neyts J., Paeshuyse J. (2011) Inhibition of hepatitis C virus replication by semisynthetic derivatives of glycopeptide antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1287–1294.
 65. De Burghgraeve T., Kaptein S.J.F., Ayala-Nunez N.V., Mondotte J.A., Pastorino B., Printsevskaya S.S., de Lamballerie X., Jacobs M., Preobrazhenskaya M., Gamarnik A.V., Smit J.M., Neyts J. (2012) An analogue of the antibiotic teicoplanin prevents flavivirus entry *in vitro*. *PLoS One*. **7**, e37244–e37252
 66. Szűcs Z., Csavas M., Roth E., Borbas A., Batta G., Perret F., Ostorhazi E., Szatmari R., Vanderlinden E., Naesens L., Herczegh P. (2017) Synthesis and biological evaluation of lipophilic teicoplanin pseudoaglycon derivatives containing a substituted triazole function. *J. Antibiot.* **70**, 152–157.
 67. Bereczki I., Szűcs Z., Batta G., Nagy T.M., Ostorházi E., Kövér K.E., Borbás A., Herczegh P. (2022) The first dimeric derivatives of the glycopeptide antibiotic teicoplanin. *Pharmaceuticals*. **15**, 77–92.
 68. Bereczki I., Csávás M., Szűcs Z., Róth E., Batta G., Ostorházi E., Naesens L., Borbás A., Herczegh P. (2020) Synthesis of antiviral perfluoroalkyl derivatives of teicoplanin and vancomycin. *ChemMedChem*. **15**, 1661–1671.
 69. Коцца Д., Фортуна М., Меггио Ф., Сарно С., Куббутат М.Х.Д., Тотцке Ф., Шаехтеле С., Пинна Л.А., Олсуфьева Е.Н., Преображенская М.Н. (2018) Гидрофобные производные гликопептидных антибиотиков как новый класс ингибиторов протеинкиназ. *Биохимия*. **83**, 1523–1533.
 70. Ma L., Li Y., Shi T., Zhu Z., Zhao J., Xie Y., Wen J., Guo S., Wang J., Ding J., Liang C., Shan G., Li Q., Ge M., Cena S. (2023) Teicoplanin derivatives block spike protein mediated viral entry as pan-SARS-CoV-2 inhibitors. *Biomed. Pharmacother.* **158**, 114213–114223.
 71. Ghosh M., Miller P.A., Miller M.J. (2020) Antibiotic repurposing: bis-catechol- and mixed ligand (bis-catechol- mono-hydroxamate)-teicoplanin conjugates are active against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antibiot.* **73**(3), 152–157.
 72. Hanckok R.E.W., Farmer S.W. (1993) Mechanism of uptake of degluco-teicoplanin amide derivatives across outer membranes of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**(3), 453–456.
 73. Yarlagadda V., Manjunath G.B., Sarkar P., Akkapeddi P., Paramanandham K., Shome B.R., Ravikumar R., Haldar J. (2016) Glycopeptide antibiotic to overcome the intrinsic resistance of gram-negative bacteria. *ACS Infect. Dis.* **2**(2), 132–139.
 74. Acharya Y., Bhattacharyya S., Dhanda, G., Haldar J. (2022) Emerging roles of glycopeptide antibiotics: moving beyond gram-positive bacteria. *ACS Infect. Dis.* **8**, 1–28.
 75. Antonoplis A., Zang X., Wegner T., Wender P.A., Cegelski L. (2019) A vancomycin-arginine conjugate inhibits growth of carbapenem-resistant *E. coli* and targets cell-wall synthesis. *ACS Chem. Biol.* **14**(9), 2065–2070.
 76. Chosy M.B., Sun J., Rahn H.P., Liu X., Brčić J., Wender P.A., Cegelski L. (2024) Vancomycin-polyguanidino dendrimer conjugates inhibit growth of antibiotic-resistant gram-positive and gram-negative bacteria and eradicate biofilm-associated *S. aureus*. *ACS Infect Dis.* **10**(2), 384–397.
 77. Тевяшова А.Н., Олсуфьева Е.Н., Преображенская М.Н. (2015) Создание антибиотиков двойного действия как путь поиска новых перспективных лекарственных препаратов. *Успехи химии*. **84**, 61–97.
 78. Koh A.J.J., Thombare V., Hussein M., Rao G.G., Li J., Velkov T. (2023) Bifunctional antibiotic hybrids: a review of clinical candidates. *Front. Pharmacol.* **14**, 1158152.
 79. Long D.D., Aggen J.B., Chinn J., Choi S.K., Christensen B.G., Fatheree P.R., Green D., Hegde S.S., Judice J.K., Kaniga K., Krause K.M., Leadbetter M., Linsell M.S., Marquess D.G., Moran E.J., Nodwell M.B., Pace J.L., Trapp S.G., Turner S.D. (2008) Exploring the positional attachment of glycopeptide/β-lactam heterodimers. *J. Antibiot.* **61**, 603–614.
 80. Tevyashova A.N., Bychkova E.N., Korolev A.M., Isakova E.B., Mirchink E.P., Osterman I.A., Erdei R., Szűcs Z., Batta G. (2019) Synthesis and evaluation of biological activity for dual-acting antibiotics on the basis of azithromycin and glycopeptides. *BMCL*. **29**, 276–280.
 81. Solyev P.N., Isakova E.B., Olsufyeva E.N. (2023) Antibacterial conjugates of kanamycin with vancomycin and eremomycin: biological activity and a new MS-fragmentation pattern of Cbz-protected amines. *Antibiot.* **12**, 894–904.
 82. Surur A.S., Sun D. (2021) Macrocyclic-antibiotic hybrids: a path to clinical candidates. Approaches to overcoming bacterial resistance using the example of chemical design of glycopeptide antibiotics of the vancomycin-teicoplanin group. *Front. Chem.* **9**, 659845.

History of the Creation of a New Generation of Antibiotics of the Group of Polycyclic Glycopeptides

E. N. Olsufyeva^{1,*}

¹*Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia*

**e-mail: eolsufeva@list.ru*

Increased resistance to polycyclic glycopeptide antibiotics has become a serious problem for chemotherapy of infections caused by resistant Gram-positive bacteria. Chemical modification of known natural antibiotics is the main direction in the creation of new generation anti-infective drugs. Over the past two decades, a series of hydrophobic glycopeptide analogues active against resistant strains of Gram-positive bacteria have been developed, three of which – oritavancin, telavancin, and dalbavancin – were approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in 2013–2014 for the treatment of infections caused by sensitive and resistant strains of staphylococci and enterococci. It has been established that hydrophobic derivatives of glycopeptides can act on resistant strains of bacteria by a mechanism that does not allow binding to the modified target of resistant bacteria. Understanding the mechanism of action of natural and modified glycopeptides is considered as the basis for the rational design of compounds with valuable properties to achieve fundamental results. The possibility of using semi-synthetic glycopeptide analogues in the fight against viral infections caused by envelope viruses is also considered. The review outlines the main ways of chemical design in creating a new generation of glycopeptide antibiotics that overcome resistance to Gram-positive pathogens, and the mechanisms of their action.

Keywords: antibiotics, glycopeptides, resistance, synthesis, mechanism of action, antibacterial activity, antiviral activity

УДК 579.25

СЕКРЕТЫ ВЫЖИВАНИЯ *Neisseria gonorrhoeae*: ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ПАТОГЕНЕЗ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

© 2024 г. Б. Л. Шаскольский^{а, *}, И. Д. Кандинов^а, Д. А. Грядунов^а, Д. В. Кравцов^а

^аЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: bls@shaskolskiy.ru

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 22.04.2024 г.

Принята к публикации 24.05.2024 г.

Несмотря на почти столетнюю историю терапии гонококковой инфекции разнообразными антимикробными препаратами, в мире ежегодно регистрируют более 80 млн случаев данного заболевания. Возбудитель гонореи *Neisseria gonorrhoeae* обладает исключительными способностями формировать устойчивость к антибиотикам благодаря высокой генетической пластичности. Будучи облигатным патогеном, гонококк выработал механизмы, позволяющие обходить защитные системы хозяина, взаимодействуя как с врожденным, так и с адаптивным иммунитетом у мужчин и женщин, и способен обитать внутри эпителиальных клеток, макрофагов и нейтрофилов. Благодаря генетической изменчивости и горизонтальному транспорту генов сформировались штаммы, резистентные к каждому из препаратов, применяемых в терапии гонореи. Ключевую роль в горизонтальной передаче генов играет система секреции типа IV, функциональность которой служит двигателем развития устойчивости к антимикробным препаратам. В представленном обзоре рассмотрены механизмы патогенеза гонококковой инфекции и ускользания возбудителя от иммунного ответа, формирования его устойчивости к антибиотикам и генетической изменчивости, методы лабораторного анализа и тенденции в развитии новых подходов к диагностике и терапии гонококковой инфекции.

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, горизонтальный перенос генов, T4SS, устойчивость к антимикробным препаратам, бактериальный патогенез

DOI: 10.31857/S0026898424060032, EDN: HNAIJU

Сокращения: C3BP (C3b-binding protein) – C3b-связывающий белок; C4BP (C4b-binding protein) – C4b-связывающий белок; CEACAM (carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules) – молекула клеточной адгезии, связанная с раковоэмбриональным антигеном; cgMLST (core genome multi-locus sequence typing) – коргеномная система мультилокусного типирования; CREE (correia repeat enclosed elements) – повторяющиеся вложенные элементы корей; GGI (gonococcal genetic island) – генетический остров гонококка; HSPG (heparan sulfate proteoglycan) – гепарансульфатпротеогликан; IS (insertion sequence) – инсерционная последовательность; LOS (lipooligosaccharide) – липоолигосахарид; MLST (multilocus sequence typing) – мультилокусное типирование микроорганизмов; MME (minimal mobile elements) – минимальный мобильный элемент; NG-MAST (*N. gonorrhoeae* multi antigen sequence typing) – мультиантигенное типирование *N. gonorrhoeae*; NG-STAR (*Neisseria gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance) – типирование последовательностей для определения устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам; NIME (neisserial intergenomic mosaic elements) – нейсерийный межгеномный мозаичный элемент; NLR (NOD-like receptors) – NOD-подобный рецептор; PAMP (pathogen-associated molecular patterns) – патогенассоциированные молекулярные паттерны; RCA (regulator of complement activation) – регулятор активации комплемента; ROS (reactive oxygen species) – активные формы кислорода; SREC (scavenger receptor expressed in endothelial cells) – рецепторы-мусорщики, экспрессируемые в эндотелиальных клетках; T4SS (type IV secretion system) – система секреции типа IV; TLR (Toll-like receptors) – Toll-подобный рецептор; АМП – антимикробный препарат; ГТГ – горизонтальный транспорт генов; МПК – минимальная концентрация, подавляющая 100% микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ

Neisseria gonorrhoeae — грамотрицательная β-протеобактерия, принадлежащая к роду *Neisseria*. *N. gonorrhoeae* инфицирует преимущественно эпителий слизистой оболочки урогенитального тракта, а также других органов, таких как прямая кишка, глотка и конъюнктура [1]. В исключительных случаях *N. gonorrhoeae* способна вызывать диссеминированные гонококковые инфекции (ДГИ) и быть причиной септицемии, артрита, эндокардита, фарингита, тонзиллита, стоматита, паротита, мастита и тенозиновита [2]. До 40% случаев заболевания у мужчин [3] и до 50% случаев гонококковой инфекции у женщин [4] могут оставаться бессимптомными, что приводит к невыявленной и невылеченной инфекции, которая, в свою очередь, может повлечь за собой воспалительные заболевания органов малого таза, бесплодие у женщин и эпидидимит у мужчин, а также другие осложнения. В мире ежегодно регистрируют более 80 млн случаев гонореи [5].

Хромосома *N. gonorrhoeae* состоит из 2.2 млн.п.н. В состав внехромосомных элементов входит криптоплазмида размером 4.2 т.п.н., возможно присутствие плазмиды *pbl_{TEM}* (7.5 т.п.н.) и конъюгативной плазмиды (42 т.п.н.). Клетка гонококка содержит в среднем три генетически идентичных копии хромосомы [6, 7]. Благодаря естественной компетентности во всех фазах роста, *N. gonorrhoeae* осуществляет интенсивный горизонтальный транспорт генов (ГТГ), в том числе ассоциированных с патогенезом и устойчивостью к антимикробным препаратам [8–10]. Значительная доля изолятов *N. gonorrhoeae* имеет гонококковый генетический остров (GGI), кодирующий систему секреции IV типа (T4SS), способную выбрасывать оцДНК во внеклеточную среду. Эта ДНК участвует в ГТГ и вносит вклад в формирование биопленок в качестве структурного компонента на начальных этапах инфекции [11]. Для гонококков и других микроорганизмов рода *Neisseria*, не имеющих GGI, передача ДНК может осуществляться с помощью везикул внешней мембраны (OMV), а также посредством аутолиза, хотя и с меньшей эффективностью [12]. Механизмы горизонтального переноса являются основным фактором быстрого формирования и распространения детерминант устойчивости к антибиотикам в популяции *N. gonorrhoeae*, что стало проблемой для мирового здравоохранения.

Высокая генетическая изменчивость *N. gonorrhoeae* привела к тому, что для каждого антимикробного препарата, применяемого в терапии гонококковой инфекции, обнаружены устойчивые изоляты [13]. Все чаще встречаются мультирезистентные штаммы, способные одновременно формировать устойчивость к боль-

шинству применяемых против них препаратов [14]. Рост уровня лекарственно-устойчивых форм гонореи в мире повышается с каждым годом; описаны случаи неудачной терапии гонореи препаратами последнего поколения, что вызвано формированием суперустойчивых вариантов гонококка [15, 16]. За прошедшие десятилетия антимикробной терапии гонококк накапливал генетические детерминанты устойчивости к различным классам антибиотиков, что приводило к необходимости изменять схемы лечения, вводя новые препараты [17, 18].

Эволюционируя в течение множества поколений гонококк, как облигатный патоген, выработал механизмы, позволяющие обходить защитные системы хозяина, взаимодействуя как с врожденным, так и с адаптивным иммунитетом у мужчин и женщин, обладая при этом способностью обитать внутри эпителиальных клеток, макрофагов и нейтрофилов [1, 19–21].

РАЗВИТИЕ ИНФЕКЦИИ И ПАТОГЕНЕЗ

Выделяют следующие этапы развития вызываемой *N. gonorrhoeae* инфекции в слизистом эпителии половых путей: колонизация эпителия, инвазия в клетки хозяина, внутриклеточная персистенция и перемещение в субэпителиальную ткань (рис. 1) [20]. Ключевыми адгезинами возбудителя являются пили, белки мутности Opa, ионный канал PorB и липоолигосахарид (LOS). Под действием фрагментов пептидогликана, LOS, OMV, высвобождаемых *N. gonorrhoeae*, происходит активация Toll-подобных рецепторов (TLR2, TLR4) [22] и NOD-подобных рецепторов (NOD1, NOD2) [23], эпителиальных клеток, макрофагов и дендритных клеток (DC), что запускает каскад цитокинов и хемокинов (IL-6, IL-8, IL-1β, IL-17, интерферон-γ, TNF) посредством активации фактора транскрипции NF-κB [1, 24, 25]. Выделение провоспалительных цитокинов приводит к активации фагоцитов и лейкоцитов, их миграции в очаг инфекции и фагоцитозу *N. gonorrhoeae* [1]. Эпителиальные клетки также противодействуют *N. gonorrhoeae* с помощью аутофагии [26]. Важно отметить, что фагоциты не способны полностью элиминировать *N. gonorrhoeae*, которая может не только выживать, но и персистировать и реплицироваться как в нейтрофилах [27], так и в макрофагах [28–30]. Для противодействия адаптивному иммунитету *N. gonorrhoeae* стимулирует макрофаги к секреции иммуносупрессивного цитокина IL-10 [31]. Гонококк также подавляет Т-хелперы типа 1 и 2 и усиливает развитие клеток Th17 за счет индукции TGF-β [32]. Помимо этого, гонококковая инфекция индуцирует IL-17A [33], эффекторный цитокин Th17-клеток [25, 34]. При этом сигнализация IL-17A–NF-κB активирует

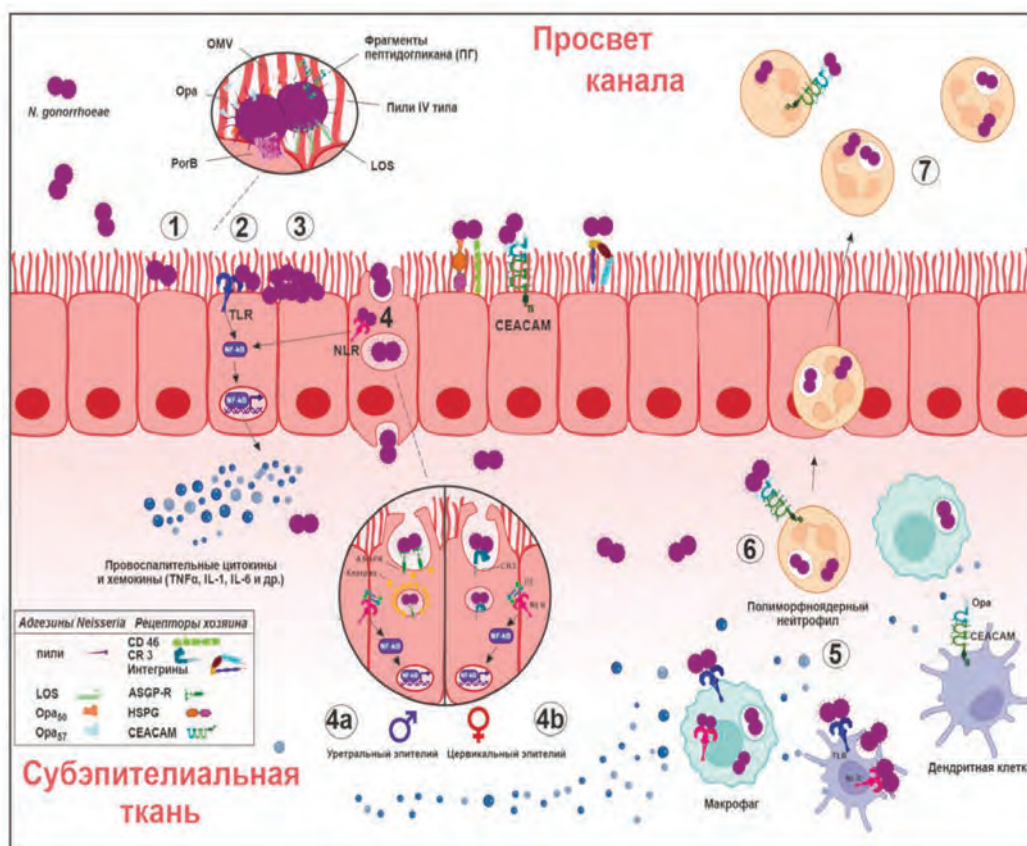


Рис. 1. Патогенез инфекции *N. gonorrhoeae*. Цифрами обозначены следующие стадии: 1 – прикрепление бактерий из просвета цервикального/уретрального канала к эпителию хозяина, инициируемое пилиями IV типа; 2 – связавшиеся с поверхностью клеток гонококки активируют Toll-подобные рецепторы, вызывая экспрессию цитокинов через путь NF- κ B; 3 – колонизация, формирование микроколоний и биопленок; 4 – эндоцитоз, инвазия и внутриклеточная персистенция гонококков, активация NOD-подобных рецепторов; 4a – взаимодействие *N. gonorrhoeae* с уретральным эпителием, связывание LOS с рецептором ASGP-R, клатрин-зависимая интернализация; 4b – взаимодействие *N. gonorrhoeae* с цервикальным эпителием, связывание пилей с рецептором CR3, клатрин-независимая интернализация; 5 – фагоцитоз *N. gonorrhoeae* макрофагами и дендритными клетками, привлеченными градиентами цитокинов; 6 – персистенция бактерий в макрофагах и нейтрофилах; 7 – эффлюкс нейтрофилов способствует распространению *N. gonorrhoeae* в составе гнойного экссудата.

несколько цепей отрицательной обратной связи, которые сдерживают активацию NF- κ B [35].

Начальной стадией гонококковой инфекции является прикрепление бактерии к апикальной стороне эпителия хозяина с использованием пилей типа IVa – многофункциональных мембраносвязанных тонких (≈ 6 –8 нм) и длинных (>1 мкм) филаментов, необходимых для вирулентности многих грамотрицательных патогенов [36]. Пили способны связываться с рецепторами, входящими в систему комплемента, такими как CR3 (гетеродимер интегринов CD11b/CD18), в женском мочеполовом эпителии [37, 38] и с регуляторным фактором комплемента CD46 (мембранный кофакторный белок) [39], экспрессирующимся в эпителии женских половых органов,

а также с I-доменсодержащими интегринными (IDC), которые могут служить рецепторами пилей в тканях уретры [40]. Показано, что пили значительно изменяются во время инфекции и обладают разной способностью к адгезии [41]. Антигенные вариации пилей происходят за счет рекомбинаций гена *pilE*, кодирующего наружный белок пилин, с одним из 19 вариантов этого гена (*pilS*) без промотора под действием RecF-подобных белков [42]. Помимо прикрепления к различным клеткам и тканям, пили играют роль в формировании микроколоний, подвижности и естественной компетентности [43].

Дальнейшему связыванию, а также последующим адгезии и колонизации, способствуют белки мутности Opa, гены которых представлены в ге-

номе не менее чем в 10 копиях. Каждый из генов *ora* способен к независимой фазовой вариации из-за ошибок в репарации пентамерных повторов СТСТТ [44], что ведет к прекращению или восстановлению экспрессии *ora*. Связывание белков Ора с рецепторами происходит за счет гипервариабельных петель [45]. Выделяют два множества белков Ора: Ора₅₇, связывающихся с семейством молекул клеточной адгезии раковоэмбрионального антигена CEACAM, и Ора₅₀, взаимодействующих с гепарансульфатпротеогликанами HSPG и белками внеклеточного матрикса ECM [46]. Большинство белков Ора связываются с рецепторами CEACAM, среди которых выделяют 12 типов. Часть из них экспрессируется на клетках, имеющих отношение к патогенезу гонококковой инфекции, включая нейтрофилы, эндотелиальные и эпителиальные клетки [46]. Взаимодействие между CEACAM и белками Ора *N. gonorrhoeae* позволяет гонококку прикрепляться к клеткам человека, колонизировать их, а также инициирует поглощение бактерий клетками хозяина [47] и способствует их выживанию в нейтрофилах [48].

Ионный канал PorB принимает участие в таких процессах, как адгезия, инвазия и ускользание от иммунного ответа посредством связывания с белками активации комплемента хозяина из семейства RCA, а также подавления антибактериальных процессов в нейтрофилах и макрофагах [19]. Показано, что везикулы внешней мембраны, содержащие PorB, вызывают апоптоз макрофагов [49]. Подобным же образом присутствующий в OMV PorB играет ключевую роль в выживании гонококка в эпителиальных клетках, вызывая митофагию (селективное разрушение митохондрий путем аутофагии) для уменьшения митохондриальной секреции активных форм кислорода (ROS) [50]. По структуре PorB – гомотримерный порин внешней мембраны (размеры мономеров от 32 до 38 кДа), стабилизированный пептидогликансвязывающим белком RmpM [51]. PorB разделяют на два класса: PorB_{IA} и PorB_{IB}. Большинство изолятов *N. gonorrhoeae* (78% из 19018 геномов, собранных со всего мира) содержат изоформу гена *porB1b*. Каждый класс *porB* обладает широким генетическим разнообразием [8], а сам ген не подвергается фазовым вариациям. Штаммы, экспрессирующие ген *porB1a*, с большей вероятностью вызывают диссеминированную гонококковую инфекцию [52, 53]. Выявлены специфичные взаимодействия PorB_{IA} с гликопротеином Gp96 человека и рецептором-мусорщиком SREC. Показано, что Gp96 действует как фактор, способствующий адгезии и препятствующий инвазии, а SREC облегчает инвазию в клетки хозяина, внося свой вклад в патогенез диссеминированной гонорей [53]. Согласованное взаимодействие PorB и пилей с клеткой хозяина вызывает

изменения концентрации кальция [54]. Увеличение концентрации свободного Ca²⁺ в цитозоле индуцирует транспорт основного белка лизосомной мембраны Lamp1 в плазматическую мембрану, где он расщепляется протеазой иммуноглобулина A1 (IgA1), секретируемой *N. gonorrhoeae*, что ведет к уменьшению числа лизосом в инфицированных клетках [55, 56]. Эти события способствуют внутриклеточному выживанию (персистенции) *N. gonorrhoeae* [57].

Половина массы внешней мембраны *N. gonorrhoeae* приходится на LOS [58] – разветвленный олигосахарид, прикрепленный к мембране через липид А. Одна из функций LOS – адгезия и инициация инвазии клеток *N. gonorrhoeae* за счет связывания с рецепторами асиалогликопротеинов (ASGP-R) на клетках уретрального эпителия [59] и эндометрия [60]. Длина и состав LOS зависят от генов *lgt*, кодирующих цитозольные гликозилтрансферазы. Фазовые вариации цитозольных гликозилтрансфераз, которые ферментативно определяют гликановый профиль молекул LOS, приводят к изменению структуры LOS [61, 62]. Ключевой модификацией LOS является сиалирование – присоединение остатка N-ацетилнейраминной кислоты (Neu5Ac) к лакто-N-неотетрозе (LNnT) – терминальному сахару LOS – с помощью сиалилтрансферазы Lst. Важно отметить, что *N. gonorrhoeae* не синтезирует Neu5Ac из-за потери гена *siaB* и должна получить ее извне [63]. С сиалированием LOS связано одно из различий в патогенезе гонококковой инфекции у мужчин и женщин. Сиалирование LOS уменьшает вирулентность гонококков у мужчин, вызывает устойчивость к компонентам гуморального иммунитета, снижает эффективность киллинга под действием нейтрофилов и антимикробных пептидов [64]. Инфицирование клеток женского мочевого тракта не зависит от сиалирования LOS. При этом десиалирование LOS, необходимое для передачи гонококковой инфекции от женщин к мужчинам, может происходить под действием сиалидаз, обнаруженных в цервикагинальном секрете [65].

Механизмы ускользания от иммунного ответа

Иммунная система человека способна лишь к частичной эрадикации гонококка. Механизмы ухода *N. gonorrhoeae* от иммунного ответа выяснены не полностью, хотя информация весьма обширна, поэтому приведем только ключевые механизмы. Расположенные на внешней мембране *N. gonorrhoeae* антигены ограничивают эффективность лизоцима хозяина, системы комплемента и распознавания PAMP-рецепторами (pathogen-associated molecular patterns). В геноме гонококка присутствуют гены двух ингибиторов лизоцима человека с-типа: белка адгезинового комплекса ACP [66] и ингибитора лизоцима

SiIC, не являющегося адгезином [67]. Сиалированный LOS ингибирует все три пути активации комплемента, уменьшая связывание IgG и осаждение компонента C4 системы комплемента на клетку патогена [68], связывая фактор H [69] и блокируя взаимодействие маннозосвязывающего лектина MBL, компонентов C4 и C3b [70]. PorB, особенно PorB_{1A}, может связывать ингибитор комплемента C4BP [71] и фактор H [72]. Кроме того, взаимодействие C4BP с белками Ора подавляет продукцию ROS и предотвращает фагоцитоз *N. gonorrhoeae* нейтрофилами [21]. Связывание адгезина ОраА с ингибитором комплемента витронектином может способствовать формированию устойчивости к комплементу [73]. Показано, что в удерживании витронектина и фактора H участвующий гепарин, связывающийся с Ора [74]. Cole и соавт. [75] показана устойчивость *N. gonorrhoeae* к гуморальному иммунитету из-за связывания белков Ора с C4BP. Ускользанию от комплемента способствует связывание IgG с мембранным белком Rmp, в результате чего образующийся комплекс компонентов системы комплемента с *N. gonorrhoeae* перестает быть летальным [76–78]. Истощение антител к Rmp приводит к эрадикации патогена [78]. Следует отметить, что *N. gonorrhoeae* не удается полностью ускользнуть от комплемента, о чем свидетельствует ДГИ у пациентов с дефектами системы комплемента [79, 80].

Локальный иммунный ответ на развитие гонококковой инфекции приводит к инфильтрации нейтрофилов, не способных к эрадикации патогена. Для ускользания от нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) *N. gonorrhoeae* секретирует нуклеазу Nuc, разрушающую NET и повышающую внеклеточное выживание гонококка в присутствии нейтрофилов [81]. Механизмы выживания в нейтрофилах включают подавление продукции ROS и неокислительных цитотоксических белков и пептидов [27, 30]. Один из механизмов подавления ROS в нейтрофилах обусловлен наличием фенотипа Ора⁻ [82]. В противном случае результатом взаимодействия клетки патогена с рецепторами SEACAM3 нейтрофилов является фагоцитоз с последующей продукцией ROS [27, 30]. Следует отметить, что нейтрофилы в суспензии не способны осуществлять фагоцитоз неопсонизированных клеток *N. gonorrhoeae* с фенотипом Ора⁻, однако приобретают такую способность после добавления IL-8 [83]. Другой механизм фагоцитоза, позволяющий *N. gonorrhoeae* избегать уничтожения нейтрофилами, осуществляется через рецептор комплемента CR3 [84]. Каноническим лигандом CR3 является комплементарный фрагмент iC3b, однако известен целый ряд лигандов CR3, включая белки внеклеточного матрикса, бактериальные токсины, липополисахарид и адгезины [85–88]. По-

давлению антимикробного ответа нейтрофилов на гонококковую инфекцию также способствует сиалированный LOS [89]. Следует отметить, что несмотря на целый спектр механизмов защиты от ROS, включающих каталазу, супероксиддисмутазу, систему импорта марганца, ферменты репарации ДНК, *N. gonorrhoeae* не способна выживать в нейтрофилах при окислительном стрессе [27].

Существует ряд механизмов ускользания *N. gonorrhoeae* от макрофагов [28]. Гонококковый LOS имитирует сахараиды человека, что приводит к снижению эффективности распознавания бактерий фагоцитами [90]. Многократное изменение белков на поверхности клеток *N. gonorrhoeae* предотвращает связывание антител и способствует ускользанию от опсонического фагоцитоза [74]. Еще один механизм, препятствующий опсонизации, – взаимодействие фактора H с порином PorB, которое предотвращает связывание iC3b [55]. Важный фактор выживания *N. gonorrhoeae* в нейтрофилах – связывание C4BP, осуществляемое преимущественно PorB, необходимо и достаточно для подавления индуцированной *N. gonorrhoeae* продукции ROS нейтрофилами и предотвращения фагоцитоза нейтрофилами клеток с фенотипом Ора⁺ [21]. *N. gonorrhoeae* подавляет апоптоз и аутофагию макрофагов [29, 91]. Кроме того, *N. gonorrhoeae* могут стимулировать макрофаги к принятию фенотипа M2, ассоциированного с иммуносупрессивными функциями и неспособного стимулировать деление Т-клеток [92].

Адаптивный иммунитет хозяина к *N. gonorrhoeae* весьма ограничен. Гонококк подавляет Th1/Th2-зависимый адаптивный иммунитет, индуцируя выработку TGF-β и стимулирует Th17-клеточный ответ [93]. Мыши, которым вводили антитела к TGF-β во время первичного заражения, смогли выработать антитела к гонококку и противостоять повторному заражению [93]. Помимо этого, подавление иммунного ответа обусловлено способностью *N. gonorrhoeae* индуцировать выработку IL-10 [31]. Ключевую роль в подавлении способности дендритных клеток стимулировать пролиферацию CD4⁺ Т-клеток играет белок PorB [94]. Адаптивный иммунитет против гонококковой инфекции практически отсутствует даже при симптоматической инфекции, при этом часто встречается повторное инфицирование гонококками [95, 96]. Причины слабого адаптивного иммунитета связаны со способностью *N. gonorrhoeae* ускользать от врожденного иммунитета за счет фазовых вариаций антигенов и наличием у нее механизмов, препятствующих развитию как В-, так и Т-клеточного иммунитета.

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Формирование устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам (АМП), в большинстве случаев ассоциировано с нуклеотидными заменами, заимствованием плазмид, рекомбинацией генов, приобретенных в результате селективного отбора [97, 98]. Молекулярные механизмы лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* можно разделить на следующие группы.

- Модификация мишени АМП, ассоциированная с мутациями в хромосомных генах. Так, изменение пенициллинсвязывающих белков (ПСБ) приводит к устойчивости к β -лактамам антибиотикам [99, 100]. Мутации в генах, кодирующих ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, вызывают устойчивость к фторхинолонам, а нуклеотидные замены в генах, кодирующих рРНК, снижают чувствительность к аминогликозидным и макролидным антибиотикам [101–103].
- Синтез белков, предотвращающих связывание препарата с его мишенью. Например, белки TetM защищают рибосомы от тетрациклинов

[104, 105]. Модифицировать 23S рРНК способны также различные erm-метилазы, снижающие тем самым аффинность связывания макролидов с рибосомой [106].

- Инактивация АМП в результате активности специфичных ферментов. В частности, β -лактамазы способны гидролизовать β -лактамы антибиотиков [107, 108].
- Изменение проницаемости наружной мембраны, связанное с увеличением эффлюкса и ограничением поступления (инфлюкс) АМП в клетку. Такие механизмы обусловлены изменениями структуры пориновых каналов, которые снижают проницаемость мембраны. Так, при мутациях в генах, кодирующих белки пориновых каналов, бактерии становятся менее чувствительными к пенициллину, тетрациклину и азитромицину [109]. Важным фактором, обеспечивающим защиту от АМП в патогенных бактериях, является вывод препаратов эффлюксными системами, состоящими из комплекса трансмембранных белков [110].

История применения АМП и эволюция устойчивости к ним, включая схематичное изображение

Таблица 1. Ключевые детерминанты устойчивости *N. gonorrhoeae* к ранее применяемым и актуальным антимикробным препаратам

Антимикробный препарат	Генетическая детерминанта
Сульфонамиды	Снижение эффективности препарата за счет конкурентного ингибирования с избыточно синтезируемой аминокислотой мутации в гене <i>folP</i> : Arg228Ser
Пенициллины	мутации в гене <i>penA</i> : инсерция Asp345–346 в ПСБ2 с одновременным изменением 4–8 аминокислотных остатков в С-концевой области ПСБ2 либо мозаичные аллели <i>penA</i> , кодирующие до 70 измененных аминокислотных остатков в ПСБ2, включая последовательности из близкородственных видов <i>Neisseria</i> мутации в гене <i>mtrR</i> : “delA” в положении –35 в промоторной области, инсерция нуклеотидов insTT/instT в положении –10, мутации в кодирующей области мутации в гене <i>porB</i> : замены Gly120Lys и Ala121Asp мутация в гене <i>ponA</i> : Leu421Pro пенициллиназа: плазмиды, кодирующие фермент β -лактамазу, TEM-1 или TEM-135
Тетрациклины	мутации в гене <i>rpsJ</i> : Val57Met мутации в гене <i>mtrR</i> : “delA” в положении –35 в промоторной области, инсерция нуклеотидов insTT/instT в положении –10, мутации в кодирующей области мутации в гене <i>porB</i> , замены Gly120Lys и Ala121Asp <i>tetM</i> : ген плазмидной локализации (защита рибосом)
Аминогликозиды	мутация в гене 16S рРНК: C1192T мутации в гене <i>rpsE</i> : Thr24Pro, Lys26Glu, делеция Val25
Фторхинолоны	мутации в гене <i>gyrA</i> : Ser91Phe, Asp95Asn и Asp95Gly мутации в гене <i>parC</i> : Asp86Asn, Ser88Pro и Glu91Lys
Макролиды	мутации в гене 23S рРНК: C2611T и A2059G. Уровень устойчивости зависит от количества <i>rrn</i> оперонов с мутациями мутации в опероне <i>mtrCDE</i> , мутации в гене-репрессоре <i>mtrR</i> , мозаичные аллели генов <i>mtrCDE</i> гены метилаз 23S рРНК: <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>ermF</i>
Цефалоспорины	мозаичные аллели гена <i>penA</i> : кодируют до 70 измененных аминокислот в ПСБ2, включая последовательности из негоноккокковых видов <i>Neisseria</i> . Аминокислотные замены, ассоциированные с резистентностью: Ala311Val, Ile312Met, Val316Thr, Val316Pro, Thr483Ser, Ala501Pro, Ala501Val, Asn512Tyr, Gly545Ser мутации в гене <i>penA</i> : замены Ala501Val и Ala501Thr мутации в опероне <i>mtrCDE</i> , мутации в гене репрессоре <i>mtrR</i> , мозаичные аллели генов <i>mtrCDE</i> мутации в гене <i>porB</i> : замены аминокислот Gly120Lys, Gly120Arg и Ala121Asp

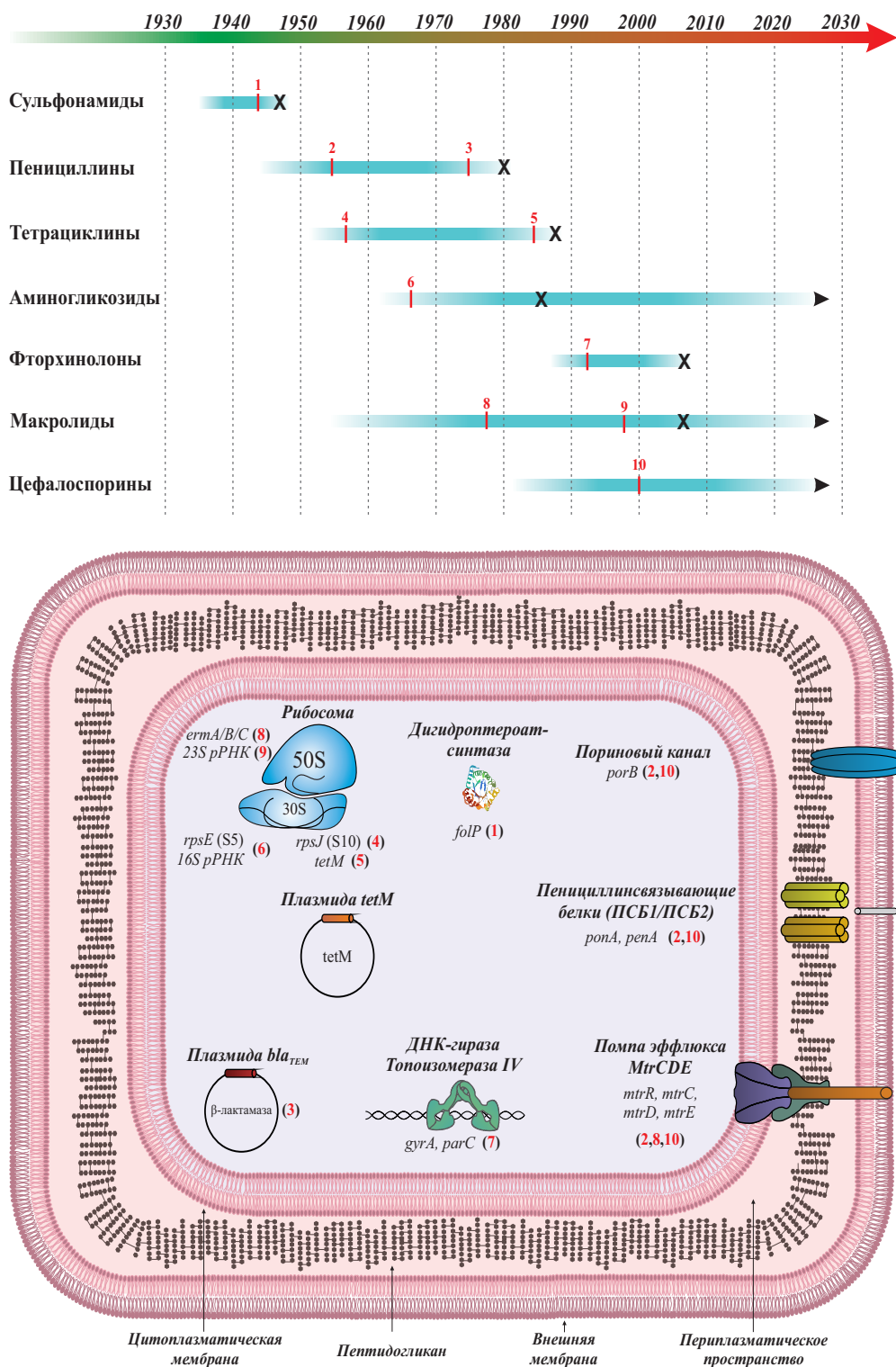


Рис. 2. История внедрения антимикробных препаратов в схемы терапии гонококковой инфекции и схематичное изображение клетки с основными мишенями действия антибиотиков и генетических детерминант устойчивости к ним. В верхней части рисунка изображена временная шкала основных рекомендованных классов антимикробных препаратов для терапии гонореи, символом (X) отмечен приблизительный год исключения препарата из протокола лечения. Красными линиями и цифрами на шкале выделена приблизительная дата обнаружения в клинической практике первых устойчивых изолятов. Нижняя часть рисунка – белки, рРНК, гены, вовлеченные в механизмы формирования устойчивости к антимикробным препаратам. Красные цифры соответствуют мишеням применяемых антибиотиков.

детерминант резистентности *N. gonorrhoeae*, представлены на рис. 2. Перечень основных генетических детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* к ранее использованному и актуальным АМП представлен в табл. 1.

Сульфонамиды

Сульфонамиды стали первыми распространенными АМП, применяемыми при гонококковой инфекции, они вошли в общую клиническую практику в середине 1930-х годов [111]. Механизм действия сульфонамидов основан на конкуренции с *n*-аминобензойной кислотой за фермент дигидроптероатсинтазу, что препятствует биосинтезу фолиевой кислоты. Устойчивость *N. gonorrhoeae* к сульфонамидам возникла в результате хромосомной мутации Arg228Ser в гене *folP*, кодирующем дигидроптероатсинтазу [112]. Также гонококки могут в избытке вырабатывать *n*-аминобензойную кислоту, что приводит к снижению эффективности препарата за счет конкурентного ингибирования [113]. Первые устойчивые изоляты появились в середине 1940-х, а уже к их концу сульфонамиды перестали использовать в терапии гонореи [114].

Пенициллины

Как и все β-лактамы антибиотики, пенициллины ингибируют синтез клеточной стенки, блокируя транспептидазную активность ПСБ. Пенициллин предложили использовать в терапии гонококковой инфекции в 1943 г. [115, 116]. Показано, что разовое введение АМП приводит к неполной элиминации патогена из организма человека, а также к селекции наиболее устойчивых штаммов, что, в свою очередь, неизбежно снижает эффективность терапии [117]. Через несколько лет после начала терапии пенициллином начали появляться изоляты со сниженной чувствительностью, что заставило клиницистов повышать терапевтическую дозу препарата, а спустя еще несколько лет были обнаружены первые резистентные изоляты [118].

Сегодня выявлено большое количество устойчивых к пенициллину штаммов, что не позволяет вернуть данный АМП в схемы терапии. Как и большинство патогенных грамотрицательных бактерий, *N. gonorrhoeae* использует несколько механизмов формирования устойчивости к пенициллинам, ассоциированных как с хромосомными, так и с плазмидными детерминантами [111, 119].

Снижение аффинности пенициллинсвязывающих белков (ПСБ). Действие пенициллина направлено на бактериальные ПСБ, которые

участвуют в синтезе пептидогликана, основного компонента клеточной стенки бактерий [120]. Поскольку синтез клеточной стенки является ключевым фактором деления и роста бактерий, изменение структуры ПСБ приводит к нарушению формы и дефекту клеточных стенок, и ведет в конечном итоге к гибели клеток [121].

Наиболее распространенной мутацией в гене *penA* (кодирует ПСБ2), ассоциированной с резистентностью *N. gonorrhoeae* к пенициллинам, является инсерция Asp345/346, локализованная на С-концевом участке белка. Эта инсерция и/или другие аминокислотные замены, такие как Ala311Val, Ile312Met, Ala501Val/Thr/Pro, Asn512Tyr, Gly542Ser, Gly545Ser, Pro551Leu/Ser способны увеличить минимальную подавляющую концентрацию (МПК) пенициллина в 6–8 раз, понижая скорость ацилирования фермента [122–124]. Замена Leu421Pro в гене *penA*, кодирующем ПСБ1, приводит к уменьшению скорости ацилирования пенициллином в 2–4 раза и к снижению чувствительности *N. gonorrhoeae* соответственно [125].

У изолятов *N. gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью к пенициллину обнаружены мотивы транспептидазного домена ПСБ из других близкородственных видов *Neisseria* [126, 127]. Мозаичный ген *penA* является ключевой детерминантой устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам антибиотикам, включая пенициллины и цефалоспорины (см. ниже).

Вывод АМП из клетки посредством эффлюксных насосов. Большинство эффлюксных насосов *N. gonorrhoeae* состоят из трех полипептидных цепей – компонентов внешней и внутренней мембраны, а также периплазматического белка MFP (membrane fusion protein). В собранном виде трехкомпонентные системы эффлюкса пронизывают внутреннюю и внешнюю мембраны и периплазматическое пространство между ними. Формирование устойчивости к АМП обусловлено нарушением в работе эффлюксных насосов и связано со сверхэкспрессией кодирующих их генов или изменением конформации белков помпы, ассоциированных с мутациями в хромосомных генах [128, 129].

Устойчивость к АМП ассоциирована с полиморфизмом оперона *mtrCDE*, кодирующего эффлюксный насос MtrCDE и белок-репрессор транскрипции MtrR. Замены Ala39Thr, Arg44His, Gly45Asp, Leu47Pro а также делеция *delA* в положении –35 промоторной области и/или инсерция insTT/insT в положении –10 приводят к увеличению экспрессии всего эффлюксного насоса MtrCDE и усиленному выводу АМП из клетки [130, 131]. Кроме того, в результате горизонтального переноса между *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*

и комменсальными *Neisseria* spp., такими как *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. flavescens*, могут вызывать мозаичные аллели оперона *mtrCDE*. Мозаичные варианты генов *mtrR* и *mtrD* способны вызывать изменения в функционировании эффлюксной системы MtrCDE, приводящие к усиленному выводу АМП из клетки, а значит, к повышению МПК пенициллина [132, 133].

Стоит отметить, что большинство эффлюксных насосов способны транспортировать субстраты АМП разных классов. По этой причине штаммы с повышенной активностью таких насосов часто имеют сниженную чувствительность к нескольким препаратам [134].

Изменение проницаемости пориновых каналов. Изменение проницаемости PorB приводит к снижению притока АМП в периплазму, т.е. к понижению чувствительности к ним [135]. Замены Gly120Asp, Gly120Lys, Ala121Asp и Ala121Asn в PorB ассоциированы со снижением чувствительности к целому ряду АМП, включая пенициллин, тетрациклин, ципрофлоксацин и цефалоспорины разных поколений [109, 136].

Штаммы *N. gonorrhoeae*, продуцирующие пенициллиназу. Гонококки, несущие плазмиды с геном *bla*, способны продуцировать β-лактамазы семейства TEM, гидролизующие связь C-N в β-лактамом кольце антибиотика [137]. У *N. gonorrhoeae* выявлены различные варианты гена *bla*, кодирующие β-лактамазы типов TEM-1, TEM-135 и TEM-220 [138, 139], расщепляющих пенициллина.

Первые резистентные штаммы *N. gonorrhoeae* с плазмидами *pbla_{TEM}* обнаружили в 1976 г. в Азии, а позднее в Африке [140, 141], что позволило классифицировать их как “Азиатские” (длина 7426 п.н.) и “Африканские” (5599 п.н.) плазмиды в соответствии с их эпидемиологическим происхождением. Позднее у *N. gonorrhoeae* идентифицировали шесть других плазмид, ассоциированных с устойчивостью к пенициллинам, названных согласно географическому источнику: Торонто (5154 п.н.), Рио (5154 п.н.), Ним (6798 п.н.), Новая Зеландия (9309 п.н.), Йоханнесбург (4865 п.н.) и Австралия (3269 п.н.) [142–144]. Продуцирующие пенициллиназу изоляты *N. gonorrhoeae* обладают чрезвычайно высокими значениями МПК (16–32 мг/л) пенициллина в сравнении с МПК штаммов, имеющих только хромосомные мутации (0.008–2.0 мг/л). Быстрое распространение высокорезистентных штаммов *N. gonorrhoeae* с плазмидами *bla_{TEM}*, наряду с хромосомными мутациями, привело к отказу от терапии гонококковой инфекции пенициллинами в начале 1980-х [145].

Тетрациклины

Механизм действия тетрациклинов связан с подавлением синтеза белков в клетках бактерий посредством нарушения взаимодействий аминоацил-тРНК с 16S рРНК рибосомной субъединицы 30S. Устойчивость *N. gonorrhoeae* к тетрациклинам опосредована различными факторами: эффлюксом (удаление антибиотика из клетки), нарушением проницаемости наружной мембраны (мутации в гене *porB*), изменением конформации рибосомного белка S10 за счет мутаций в кодирующем его гене *rpsJ*, а также защитой рибосом путем экспрессии белка TetM [105, 146, 147]. Тетрациклин был рекомендован для терапии гонококковой инфекции в начале 1950-х годов и назначался пациентам с индивидуальной непереносимостью β-лактамов. Через несколько лет после начала терапии обнаружили штаммы со сниженной чувствительностью к тетрациклину. Такие изоляты содержали замену Val57Met в белке S10, уменьшая сродство тетрациклина к нему [105, 148]. Сопутствующие мутации в опероне *mtrCDE*, ассоциированные с выбросом тетрациклинов из клетки, также снижают чувствительность бактерий.

В середине 1980-х обнаружили изоляты *N. gonorrhoeae*, несущие плазмиду с геном *tetM*, кодирующим белок защиты рибосом TetM. Этот белок является структурным аналогом фактора элонгации EF-G, также обладающим GTPазной активностью. Связывание TetM с рибосомой вытесняет молекулу тетрациклина и предотвращает подавление синтеза белка. Изоляты *N. gonorrhoeae* с плазмидами с *tetM* характеризовались сверхвысокими уровнями устойчивости к тетрациклину, что быстро привело к исключению данного препарата из схем терапии [149].

Известно, что ген *tetM N. gonorrhoeae* расположен на конъюгативной плазмиде, способствующей горизонтальному переносу иных плазмид [150]. При анализе механизма приобретения лекарственной устойчивости следует обращать особое внимание на изоляты *N. gonorrhoeae*, резистентные к тетрациклину и несущие плазмиду с *tetM*, поскольку ее присутствие облегчает конъюгативный перенос плазмид с *bla_{TEM}* [151]. Подобные мультирезистентные изоляты обладали чрезвычайно высокими уровнями МПК к пенициллину и тетрациклину и стремительно распространились по всему миру. Количество изолятов *N. gonorrhoeae* с *tetM* и *pbla_{TEM}* в мировой популяции достаточно велико, что не позволяет вернуть эти АМП в схему терапии гонококковой инфекции [152, 153].

Аминогликозиды

Макролиды

Аминогликозидные антибиотики связываются с сайтом распознавания аминоацил-тРНК в 16S рРНК, входящей в состав 30S субъединицы, что приводит к подавлению синтеза белка и последующей гибели клеток. Штаммы гонококков, имеющие низкую чувствительность к спектиномицину, обладают хромосомными детерминантами устойчивости, среди которых однонуклеотидные замены в гене *rrs* (G1064C, G1058C и C1192T в сайте связывания аминогликозидов 16S рРНК), замена Thr24Pro и делеция Val27 одновременно с мутацией Lys26Glu в гене *rpsE*, кодирующем 5S субъединицу [154]. Изменения в структуре белка 5S, вероятно, нарушают связывание с 16S рРНК, что приводит к высокому уровню устойчивости к спектиномицину [155].

В терапии гонококковой инфекции применяли стрептомицин, канамицин, спектиномицин (2.0 г однократно внутримышечно), рекомендованный в России пациентам с индивидуальной непереносимостью β-лактамов антибиотиков [153, 156, 157]. В настоящее время устойчивость *N. gonorrhoeae* к аминогликозидам встречается чрезвычайно редко [158].

Фторхинолоны

Фторхинолоны – синтетические препараты, не имеющие природного аналога, действие которых направлено на топоизомеразу IV, состоящую из двух субъединиц – ParC и ParE, и ДНК-гиразу, также состоящую из субъединиц GyrA и GyrB. Участок связывания комплекса ДНК–ДНК-гираза с хинолонами получил название “хинолоновый карман”. Попадание хинолона в карман останавливает движение ДНК-гиразы, а затем и продвижение репликационной вилки [159].

Фторхинолоны, особенно ципрофлоксацин, стали препаратом выбора для терапии гонококковой инфекции в конце 1980-х годов, а первые устойчивые изоляты появились уже в начале 1990-х [160]. Механизм устойчивости гонококков к этой группе антибиотиков основан на снижении аффинности хинолонового кармана к препаратам и ассоциирован с мутациями Ser91Phe и Asp95Asn/Gly в гене *gyrA* и Asp86Asn, Ser87Pro и Glu91Lys в гене *parC*. К середине 2000-х на фоне распространения данных мутаций в глобальной популяции гонококка фторхинолоны были исключены из списка препаратов, рекомендованных для терапии гонореи [161].

Антимикробное действие макролидов направлено на нарушение процесса трансляции. Макролиды связываются с 23S рРНК рибосомной субъединицы 50S, блокируя канал выхода растущей пептидной цепи и заставляя рибосому высвобождать неполные, обрезанные полипептиды. Значимыми генетическими детерминантами устойчивости *N. gonorrhoeae* к макролидам являются мутации в пептидилтрансферазной петле II и V домена 23S рРНК [162]. Геном *N. gonorrhoeae* содержит четыре копии оперона *rrn* (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*), в состав которого входит ген 23S рРНК. Замена C2611T в данном локусе приводит к появлению изолятов с умеренной резистентностью (МПК до 2 мг/л), а A2058G/A2059G – высокорезистентных (МПК > 256 мг/л) [163]. Следует отметить, что уровень устойчивости к азитромицину зависит от количества мутантных аллелей гена 23S рРНК – изоляты с тремя или четырьмя мутантными аллелями являются высокорезистентными (МПК от 256 до 4096 мг/л), в то время как изоляты с одним аллелем обладают незначительным уровнем устойчивости, ниже или на уровне порогового значения МПК, составляющего 1 мг/л [164]. Кроме того, ухудшение связывания макролидов с рибосомой может быть обусловлено метилированием оснований в ключевых положениях. За это отвечает другой механизм резистентности к макролидам – наличие генов метилаз 23S рРНК группы *erm* (*erm* – erythromycin ribosome methylation) [106].

Эритромицин применяли при гонококковой инфекции с середины 1950-х гг. В 1970-е гг. у *N. gonorrhoeae* обнаружили рРНК-метилазы ErmA, ErmB, ErmC, ErmF [165], что положило конец применению эритромицина в конце 1970-х и исключению макролидов из схем монотерапии. В настоящее время метилазы 23S рРНК у *N. gonorrhoeae* встречаются редко [166].

Азитромицин рекомендован как компонент двойной терапии с 2010-х гг., в настоящее время он используется в странах ЕС совместно с цефалоспорином III поколения [17, 167]. Изоляты с мутацией A2059G в одной копии оперона *rrn*, чувствительные к азитромицину, способны быстро формировать устойчивость за счет гомологичной рекомбинации во всех четырех копиях *rrn*.

Помимо мутаций в 23S рРНК, устойчивость *N. gonorrhoeae* к макролидам обусловлена также сверхэкспрессией эффлюкс-насоса MtrCDE [168]. Устойчивость к азитромицину и другим АМП формируется за счет ряда мутаций в генах эффлюксного насоса MtrCDE и его транскрипционного репрессора (*mtrD* и *mtrR* соответствен-

но) [169, 170]. Анализ клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных на территории Российской Федерации за период 2020–2021 г., выявил существенную долю (13.6%) штаммов, устойчивых к азитромицину, несмотря на то, что данный антибиотик не рекомендован для терапии гонококковой инфекции в России. Устойчивость к азитромицину в основном связана с мозаичной структурой в промоторной области гена *mtrR* – с делецией –35 delA или мутацией Ala86Thr, а также с мозаичной структурой гена *mtrD* [130]. Филогенетический анализ современной российской популяции гонококка выявил отдельный кластер азитромицинустойчивых изолятов, относящихся к молекулярному типу, широко распространенному в европейской популяции, при этом данный кластер оказался филогенетически удаленным от эндемичных российских изолятов. Таким образом, причиной возникновения в России нового варианта возбудителя гонококковой инфекции, устойчивого к макролидам, стал трансграничный перенос резистентного штамма со специфическими генетическими детерминантами [130].

Цефалоспорины III поколения

В настоящее время в большинстве стран мира для лечения гонококковой инфекции рекомендуют цефалоспорины III поколения (цефтриаксон, цефиксим) [171, 172]. Механизм действия цефалоспоринов, как и других β-лактамов антибиотиков, основан на связывании препарата с ПСБ2 (транспептидазы) и нарушении синтеза поперечных связей пептидогликана в клеточной стенке. Одной из ключевых детерминант снижения чувствительности к цефалоспорином является мозаичный аллель гена *penA*, кодирующего ПСБ2. Такой вариант *penA* может определять до 60–70 аминокислотных замен. Он появился в результате трансформации ДНК от комменсальных видов *Neisseria* с последующей рекомбинацией [102], подобно мозаичным аллелям оперона *mtrCDE*.

Устойчивость гонококка к цефалоспорином III поколения увеличивается с каждым годом, описано немало неудачных случаев лечения гонореи [17, 173–175]. Изоляты со сниженной чувствительностью к цефалоспорином быстро распространяются по всему миру. Первоначально в Японии выявили несколько вариантов гонококков с высоким уровнем устойчивости к цефтриаксону и цефиксиму, затем изоляты этой же генетической линии нашли во многих странах ЕС [119, 176]. Следует отметить, что на территории Российской Федерации пока не зарегистрированы случаи неудачного лечения гонококковой инфекции цефалоспорином III

поколения и не обнаружены соответствующие устойчивые варианты [177, 178].

Устойчивость к цефалоспорином III поколения ассоциирована с мутациями Ala311Val, Ile312Met, Val316Thr, Val316Pro, Thr483Ser, Ala501Pro, Ala501Val, Asn512Tyr, Gly545Ser, которые встречаются в основном в аллелях гена *penA* мозаичного типа [126, 179]. Однако и немозаичные аллели *penA* содержат мутации, вызывающие повышение МПК цефалоспорином III поколения: замены остатков Ala501Val и Ala501Thr, а также Gly542Ser, Pro551Ser и Pro551Leu. Можно предположить, что эта замена возникла в результате селективного отбора гонококков, а не обусловлена переносом из других видов бактерий [14, 180, 181].

Номенклатура аллелей гена *penA* включает все их типы, в том числе, мутантные мозаичные и полумозаичные аллели. Аллели принято нумеровать римскими цифрами от I до XXXVIII [182, 183]. Основным механизмом резистентности к цефалоспорином является специфическое изменение мишени ПСБ2, однако свой вклад вносят также усиленный эффлюкс и сниженный инфлюкс, опосредованные мутациями в *mtrCDE* и *porB* соответственно. Совокупность мутаций в *penA*, *ponA*, *porB* и *mtrR* приводит к появлению изолятов с МПК цефиксима 4 мг/л, МПК цефтриаксона 1–2 мг/л. Изоляты с подобными профилями детерминант устойчивости описаны в большинстве стран Европы и Азии [126, 184].

Встречающиеся у гонококков β-лактамазы TEM-1 и TEM-135 отличаются одной аминокислотной заменой – Met182Thr [185]. Всего одна замена G→A в гене *bla_{TEM-135}* приводит к замене Gly238Ser, что превращает TEM-135 в TEM-20, которая относится к β-лактамазам расширенного спектра, способным гидролизовать как пенициллины, так и цефалоспорины. Однако клинические изоляты *N. gonorrhoeae* с β-лактамазой TEM-20 в настоящий момент не обнаружены. В то же время, данные из Китая свидетельствуют о стремительном распространении изолятов *N. gonorrhoeae* с TEM-135 [143], что вызывает опасения из-за риска появления β-лактамаз расширенного спектра действия, которые поставят точку в применении цефалоспорином III поколения. Тем не менее, эксперименты *in vitro* по созданию клеточных моделей *N. gonorrhoeae* с β-лактамазой TEM-20 показали, что жизнеспособность таких штаммов существенно снижена, что, возможно, объясняет отсутствие соответствующих клинических изолятов в природе и продлевает век применения цефалоспорином в качестве основного препарата в терапии гонококковой инфекции [186].

*Новые антимикробные препараты,
эффективные в отношении N. gonorrhoeae*

В 2016 г. ВОЗ опубликованы обновленные рекомендации по лечению гонореи, в которых подчеркнута необходимость разработки новых АМП [187]. В настоящий момент продолжают клинические исследования золифлодаина и солитромицина, прошедших третью фазу, и гепотидаина, завершившего вторую фазу [188–190].

Наиболее перспективным из перечисленных препаратов является золифлодаин, который относится к классу спиропиримидинтрионов и ингибирует бактериальную топоизомеразу II [191, 192]. Чувствительность *in vitro* к золифлодаину у клинических изолятов, выделенных в странах Евросоюза, находится на уровне МПК 0.032–0.25 мг/л. Не обнаружено перекрестной устойчивости этого препарата ни с одним из традиционно применяемых против гонококка АМП [193, 194]. *In vitro* анализ потенциальных детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* к золифлодаину показал возможность формирования ряда мутаций в гене *gyrB*, например Asp429Ala или Lys450Asn [160]. Подобные и сопутствующие замены в топоизомеразе типа II могут встречаться у изолятов *N. gonorrhoeae* в естественной среде и в перспективе привести к формированию устойчивого кластера в популяции [152, 194]. Требуется дальнейшие испытания золифлодаина, включая валидацию на большой выборке, определение оптимального режима дозирования и порогового значения МПК, разделяющего чувствительные и устойчивые изоляты.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Важным инструментом контроля гонококковой инфекции является молекулярное типирование, направленное на выявление значимых молекулярных типов (генотипов, сиквенс-типов, ST) [17, 152]. Определение генотипа изолята позволяет анализировать пути передачи гонококковой инфекции, а также идентифицировать и контролировать распространение эпидемиологически опасных клонов. К числу наиболее распространенных в настоящее время методов генотипирования *N. gonorrhoeae* относятся следующие методы.

Генотипирование NG-MAST, основанное на определении нуклеотидной последовательности двух гипервариабельных локусов *porB* (490 п.н., кодирует трансмембранный белок поринового канала) и *tbpB* (390 п.н., кодирует β-субъединицу трансферринсвязывающего белка) [195]. Создана и поддерживается мировая база данных

NG-MAST v.2.0 (<https://pubmlst.org/databases>), в которую депонированы последовательности геномных локусов *porB* и *tbpB*, позволяющие определить сиквенс-тип штамма. На 2024 год база насчитывает порядка 13000 аллелей *porB* и 3000 аллелей *tbpB* и постоянно дополняется новыми последовательностями. Отдельно стоит отметить, что генотипирование изолятов по протоколу NG-MAST позволяет достоверно различать аллели гена *porB* – *porB_{IA}* и *porB_{IB}*. Показано, что изоформа порина *PorB_{IA}* ассоциирована с диссеминированной гонококковой инфекцией, однако в мировой популяции гонококка она встречается относительно редко [8, 196, 197].

Генотипирование *N. gonorrhoeae* по протоколу NG-MAST получило широкое распространение, поскольку типы NG-MAST сцеплены с аллельными вариантами генов, которые ассоциированы с устойчивостью к АМП. Так, изоляты *N. gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью к цефалоспорином III поколения относятся, как правило, к молекулярному типу 1407 [152]. Обнаружено, что фенотипически устойчивые к азитромицину изоляты ассоциированы с типом 12302 NG-MAST, который в последние годы преобладает на территории стран Евросоюза. Появление этого варианта на территории России (рис. 3) в 2020–2021 гг. привело к резкому увеличению доли изолятов, устойчивых к азитромицину [178]. Таким образом, генотипирование по протоколу NG-MAST позволяет успешно изучать особенности генетической структуры популяции *N. gonorrhoeae* и отслеживать тенденции, которые в ней происходят.

Генотипирование MLST основано на определении нуклеотидных последовательностей семи локусов генов домашнего хозяйства: *abcZ* (ABC-транспортер), *adk* (аденилаткиназа), *aroE* (шикиматдегидрогеназа), *fumC* (фумаратгидратаза), *gdh* (глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа), *pdhC* (субъединица пируватдегидрогеназы), *pgm* (фосфоглюкомутаза) [197]. Последовательности локусов, применяемых для генотипирования по протоколу MLST, существенно консервативнее в сравнении с локусами протокола NG-MAST. Результаты типирования гонококка по протоколу MLST депонируют в базу данных PubMLST (<http://pubmlst.org/databases>).

MLST-генотипирование *N. gonorrhoeae* позволяет выделять большое количество генетических вариантов в популяции гонококка, а также выявлять эволюционно успешные генотипы. Как и NG-MAST, определенные MLST-генотипы ассоциированы с устойчивостью к АМП различных классов. Так, изоляты доминирующего в мировой популяции MLST-генотипа 1901 характеризуются сниженной чувствительностью к цефалоспорином III поколения [115]. С каж-

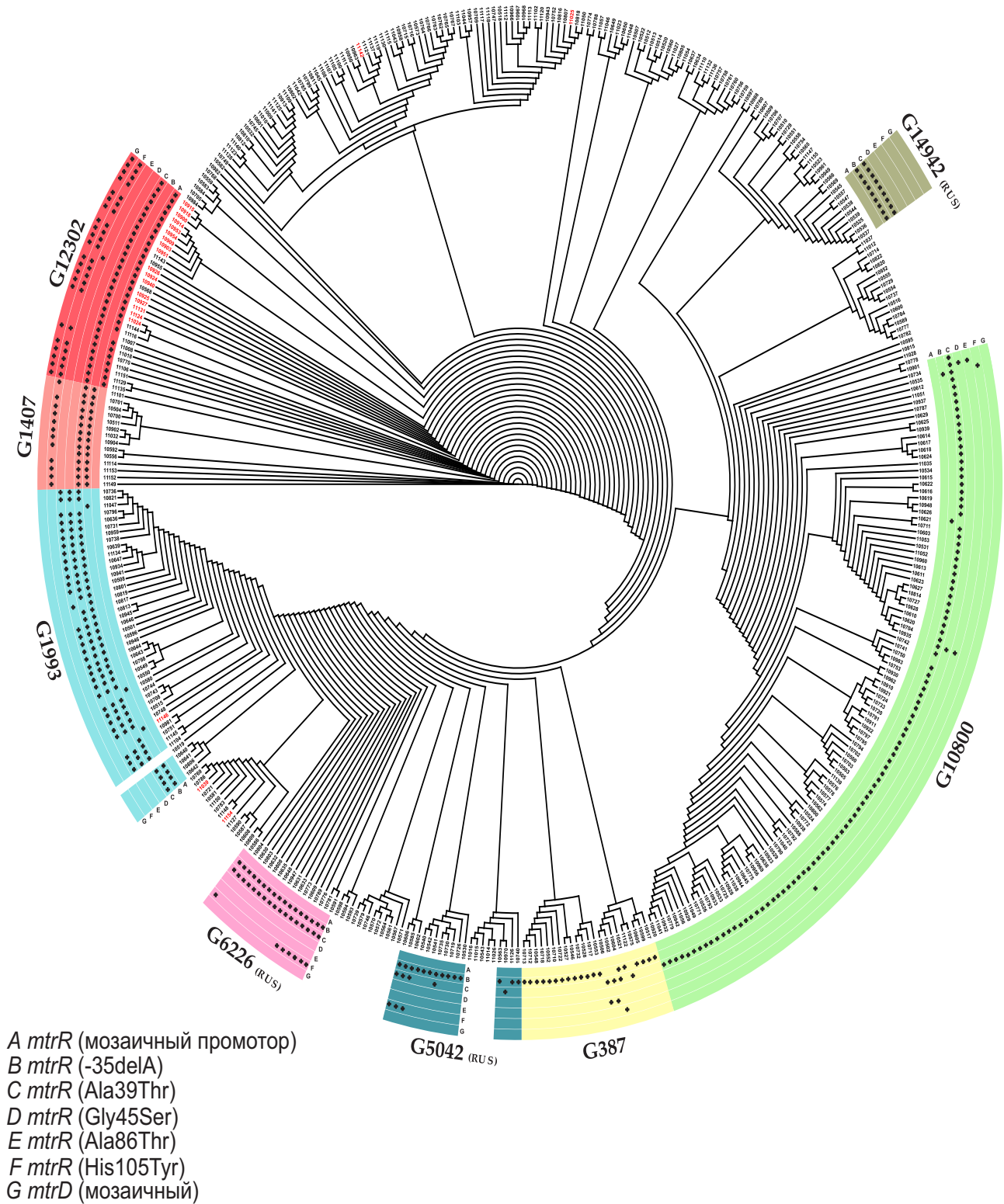


Рис. 3. Филогенетическое дерево российских изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных в 2020–2021 г., построенное на основе данных NG-MAST-типирования. Цифры по периметру круга соответствуют коду изолята, красным отмечены коды изолятов, устойчивых к азитромицину. Основные геногруппы (G10800, G387 и др.) выделены разными цветами. Обнаруженные мутации (A–G), ассоциированные с устойчивостью к азитромицину, отмечены знаком “+”. Красным выделена геногруппа G12302, включающая азитромицинустойчивые изоляты с мутациями в гене *mtrR* и мозаичными вариантами гена *mtrD*. Изоляты геногруппы G12302 филогенетически удалены от эндемичных российских изолятов геногруппы G10800 (выделена зеленым).

дым годом возрастает доля изолятов MLST 9363, ассоциированных с устойчивостью к азитромицину, что, в целом, отражает мировую тенденцию роста антимикробной резистентности *N. gonorrhoeae* [198].

NG-STAR [199] – стандартизированный метод классификации семи хорошо охарактеризованных генов *N. gonorrhoeae* (*penA*, *mtrR*, *porB*, *ponA*, *gyrA*, *parC* и 23S рРНК), ассоциированных с устойчивостью к цефалоспорином, макролидам и фторхинолонам. Комбинация аллелей семи генов позволяет установить генотип изолята по протоколу NG-STAR, а также предсказать профиль фенотипической чувствительности к АМП на основе уже описанных генотипов. База данных NG-STAR (<https://ngstar.canada.ca/>) содержит около 2000 генетических профилей, соотнесенных с данными по чувствительности к указанному выше АМП. Достоверность определения уровня устойчивости *N. gonorrhoeae* к АМП по протоколу NG-STAR составляет 95% (соответствие предсказанного значения МПК экспериментально определенному) [182]. Вместе с тем, метод NG-STAR не подходит для изучения молекулярной эпидемиологии гонококковой инфекции, поскольку в большинстве случаев *N. gonorrhoeae* распространяется по сети контактов через клональное размножение. Таким образом, в разных популяциях, как правило, присутствует большое количество идентичных NG-STAR генотипов, что не позволяет в полной мере выделять и контролировать распространение наиболее эпидемиологически значимых клонов.

cgMLST. Новые подходы к молекулярной эпидемиологии гонококковой инфекции основаны на использовании технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS), позволяющих одновременно определять как совокупность генов, характеризующих происхождение анализируемого клинического изолята, так и совокупность имеющихся у него генетических детерминант антибиотикорезистентности [200]. По сути, NGS позволяет решать задачи генотипирования по протоколам NG-MAST и MLST на более высоком уровне, при этом прямо, а не косвенно, связывая генотип изолята и его чувствительность к АМП [201]. NGS успешно применяется для идентификации детерминант резистентности, исследования филогенетических взаимосвязей, популяционной структуры и молекулярной эпидемиологии гонококка [202]. Несмотря на колоссальную информативность, методу присущи такие недостатки, как невысокая дискриминирующая способность в отношении отдельных нуклеотидов, требующая большого покрытия генома и, соответственно, дорогих наборов реагентов, отсутствие валидированных биоинформатических пайплайнов для интерпретации результатов.

Описанные методы генотипирования *N. gonorrhoeae* играют ключевую роль в проведении молекулярно-эпидемиологических исследований. В условиях растущей проблемы распространения мультирезистентных штаммов *N. gonorrhoeae* генотипирование представляет собой чрезвычайно важный и мощный инструмент не только для мониторинга гонококковой инфекции, но и для изучения процессов молекулярной эволюции в популяции гонококка.

МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ *N. gonorrhoeae*

Трансформация – ключевой путь горизонтального переноса у нейссерий

N. gonorrhoeae обладает исключительной способностью к изменению своего генетического материала благодаря механизмам горизонтального переноса и естественной компетентности во всех фазах роста. Горизонтальный перенос генов может происходить посредством конъюгации, трансформации и трансдукции, при этом трансформация, вероятно, является ключевым способом передачи хромосомной ДНК у *N. gonorrhoeae* [203]. Трансдукция гонококков бактериофагами происходит сравнительно нечасто, а конъюгация способна перенести только плазмидную ДНК [204, 205].

У большинства бактерий, способных к генетической трансформации, состояние компетентности достигается лишь на короткое время и часто в специальных условиях (электропорация, химическая трансформация). Только малая часть видов (пока описано всего 82 [206]) компетентны в естественных условиях, при этом подавляющая их часть обладает непостоянной компетентностью [207]. *N. gonorrhoeae* выделяется на их фоне, так как обладает этим свойством во всех фазах роста [205, 208, 209]. С течением времени именно высокая частота и эффективность трансформации гонококков привели к быстрому распространению детерминант устойчивости к антибиотикам в популяции *N. gonorrhoeae*, что стало проблемой для мирового здравоохранения.

Процесс трансформации клеток можно разделить на три этапа: связывание донорной ДНК, поглощение и рекомбинация [205]. Прежде чем встроиться в геном, ДНК должна быть распознана пилями клетки-реципиента по определенной 10–12-буквенной последовательности (atGCCGTCTGAA) [210], встречающейся в хромосоме *N. gonorrhoeae* и других видов *Neisseria* в среднем 1 раз на 1100 п.н. Эту последовательность называют DUS (DNA Uptake Sequence) и, вероятно, она служит своеобразным “водяным знаком”, устраняющим барьеры для проникно-

вения собственной ДНК в геноме в условиях отсутствия у гонококка функциональной системы CRISPR-Cas [211].

Механизмы передачи донорной ДНК для трансформации

Донорная ДНК может быть получена и передана гонококком с помощью автолиза, везикул внешней мембраны (OMV) или системы секреции ДНК IV типа (T4SS), наиболее изученной в настоящее время.

Автолиз

В отличие от многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, *N. gonorrhoeae* не может выживать в течение длительного времени после прекращения роста. Автолиз обычно происходит в стационарной фазе или в условиях отсутствия роста, таких как истощение питательных веществ, неоптимальные температура, pH или осмолярность [212]. Снижение жизнеспособности коррелирует с лизисом клеток, происходящим после истощения запасов глюкозы в среде [213]. Автолиз может привести к образованию клеток с поврежденной оболочкой (L-форма), способных подвергаться репарации и возобновлять рост при благоприятных условиях [214]. За процесс автолиза ответственны литические трансгликозилазы, такие как AtlA, LtgA, LtgB, LtgC, LtgX, эндопептидаза EppA, N-ацетилглюкозаминидаза NagZ и N-ацетилмураоил-L-аланин-амидаза AmiC [215, 216].

В процессе автолиза в окружающую среду выделяются фрагменты пептидогликана, обладающие цитотоксическими свойствами и способствующие селективному уничтожению реснитчатых клеток фаллопиевой трубы, что важно для развития гонококковой инфекции в органах малого таза [216]. Кроме модуляции иммунного ответа хозяина, потенциальная выгода автолиза может состоять в предоставлении ДНК для формирования биопленок, а также для естественной трансформации.

Везикулы внешней мембраны (OMV)

У *N. gonorrhoeae*, как и у *N. meningitidis*, еще одного облигатного патогена рода *Neisseria*, обнаружены OMV [214]. Они наиболее интенсивно вырабатываются в экспоненциальной фазе либо в ответ на стресс [218] и могут содержать фосфолипиды, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки, метаболиты, сигнальные молекулы и белки [223].

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что OMV гонококков влияют на клетки хозяина, стимулируя иммунный ответ в нефагоцитирующих клетках и индукцию апоптоза макрофагов [49]. Помимо этого, OMV содержат как плазмидную, так и хромосомную ДНК, обеспечивая горизонтальный перенос, в том числе, генов устойчивости к антибиотикам, например, плазмид с генами *blaTEM* [219].

Система секреции IV типа (T4SS)

Отличительным механизмом выделения хромосомной оцДНК во внешнюю среду у гонококка является система T4SS, кодируемая генами GG1. Полагают, что наличие T4SS связано с высокой эффективностью горизонтального переноса между различными популяциями *N. gonorrhoeae* из-за увеличения количества ДНК, доступной для трансформации в окружающей среде. Кроме того, T4SS играет важную роль в формировании биопленок за счет большого вклада “липкой” ДНК в построение матрикса этих пленок [11]. Функционирующая система T4SS обеспечивает в 500 раз более высокую эффективность трансформации гонококков, чем автолиз [12]. Основной комплекс T4SS гонококков состоит из мультимерных белков TraB, TraK и TraV, формирующих помпу (рис. 4). Он охватывает клеточную стенку от внутренней мембраны через периплазму до внешней мембраны. Периплазматические и трансмембранные белки TraE, TraF, TraG, TraH, TraL, TraN, TraW, TraU, Yag, DsbC и TrbC участвуют в сборке аппарата секреции и его закрепления в клеточной стенке [220–222]. Предполагается, что перед встраиванием помпы в клеточную стенку в этом месте должно произойти расщепление пептидогликана литическими трансгликозилазами AtlA и LtgX.

Ведущую роль во взаимодействии ДНК с T4SS играют белки ParA-ParB и TraI – релаксаза, принадлежащая к семейству MOB_H. Канонически ParA-ParB необходимы для точной сегрегации сестринских пар молекул ДНК в цитоплазме при делении клетки [223], но в случае T4SS *N. gonorrhoeae* они соединяются с TraI, образуя релаксосому TraI-ParAB на внутренней мембране [224]. При этом ParB, вероятно, отвечает за привлечение хромосомной ДНК к TraI, а АТР-зависимая активность ParA облегчает процесс разрезания ДНК релаксосомой. Главный компонент релаксосомы – белок TraI закреплен на внутренней мембране гидрофобным N-концом, каталитически активен в присутствии ионов Mn²⁺ и осуществляет несколько функций, включая одноцепочечный сайт-специфический разрез хромосомы по мотиву oriT, ее расплетание и повторное, но неспецифичное разрезание [225, 226]. Последовательность oriT состоит из

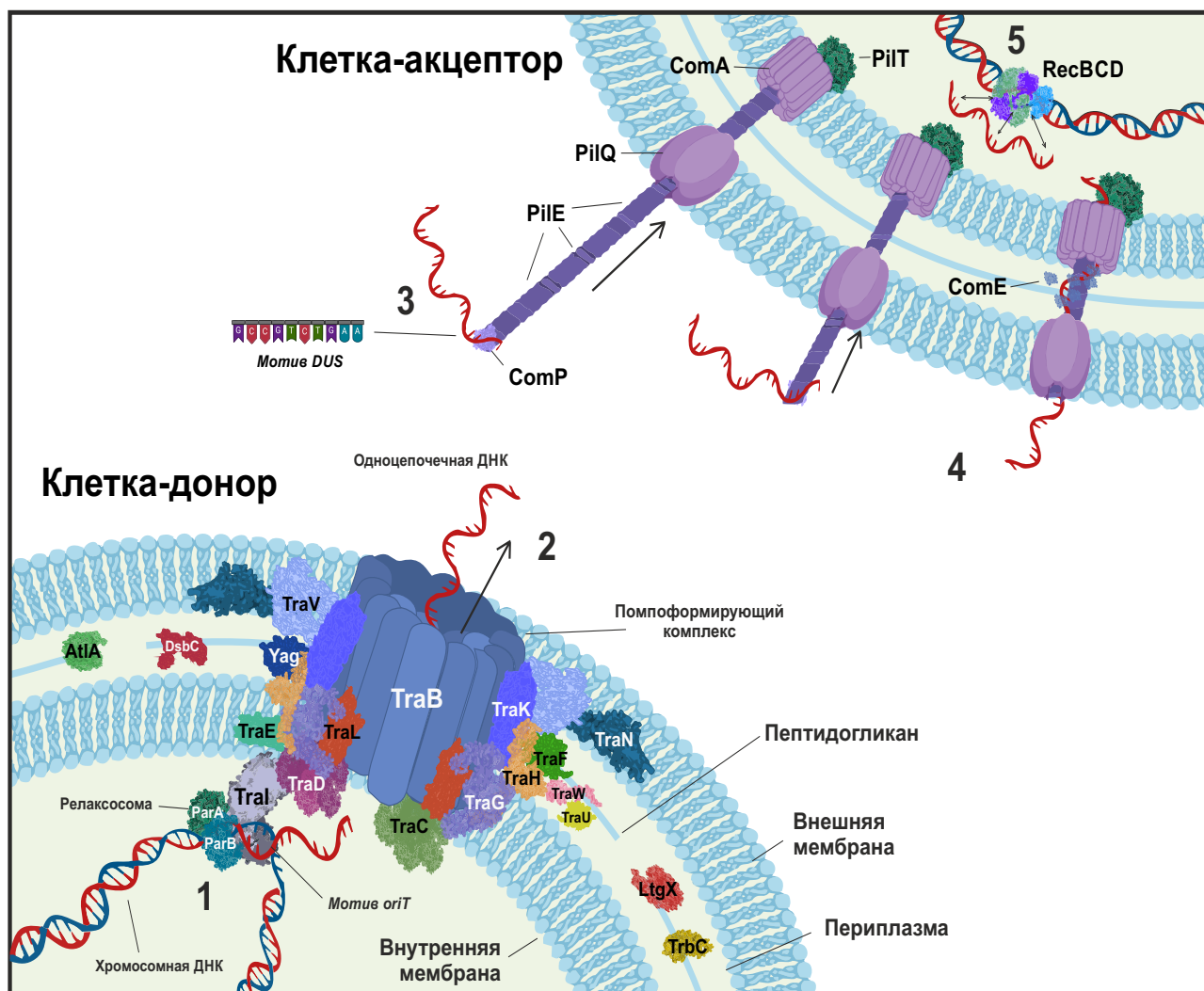


Рис. 4. Горизонтальный перенос генов *N. gonorrhoeae* с помощью T4SS. Показаны основные компоненты T4SS, системы компетентности и пилей IV типа. 1 – Релаксома TraI-ParA-ParB разрезает одну из цепей хромосомы клетки-донора по мотиву oriT, расплетает ее и производит оцДНК; 2 – оцДНК выходит через помпу T4SS за пределы клетки; 3 – находящийся во внешней среде комплекс TraI-оцДНК связывается с пиллями клетки-акцептора посредством белка компетентности ComP, распознающего мотив DUS; 4 – молекулярный мотор PilQ осуществляет стягивание пили, в результате чего ДНК переносится в периплазму через пориновый канал PilQ. Связывание ДНК с ComE препятствует обратному перемещению ДНК из клетки и способствует переносу молекулы через канал ComA в цитоплазму; 5 – ДНК встраивается в геном клетки-акцептора посредством рекомбинации RecBCD.

инвертированного повтора (IR), образующего вторичную структуру типа “шпилька”, которая распознается TraI, и *pic*-сайта, по которому этот фермент производит разрез. Кроме того, oriT присутствует и в самом GGI, способствуя его распространению в популяции.

Белок TraD способствует сопряжению релаксома TraI-ParA-ParB с остальными структурными компонентами помпы T4SS. АТРаза TraC обеспечивает транспорт оцДНК через помпу за пределы клетки, высвобождая необходимую для этого энергию из АТФ. Интересно, что образующаяся

оцДНК защищена с 5'-конца от экзонуклеаз. Предполагалось, что она выбрасывается из клетки, будучи связанной с TraI, подобно тому, как это происходит в конъюгативных T4SS-системах, и поэтому не подвержена 5'-расщеплению [226]. Однако позже выяснилось, что комплекс “TraI-оцДНК” не образуется, а 5'-деградации препятствует то, что 5'-конец, начинающийся с *pic*-сайта, находится на слишком малом расстоянии от IR-шпильки (3 н.), которая и препятствует расщеплению экзонуклеазой [225]. Оказавшись за пределами клетки, оцДНК, содержащая мотив DUS, может специфически

связаться с белком ComP на поверхности пили IV типа клетки-акцептора и участвовать в процессе естественной трансформации, изображенном на рис. 4. После связывания ДНК с ComP, мотор пили PilT с силой притягивает ДНК по направлению к клетке, чтобы затем она могла пройти через мембранный порин PilQ далее в периплазму. По мере прохождения через мембрану, ДНК связывается многими копиями белка ComE, который количественно регулирует пропускную способность периплазмы [227]. PilQ не специфичен к поступающей ДНК, он может пропускать ее как внутрь, так и наружу. ComE связывается с ДНК, препятствуя ее движению назад. Из периплазмы ДНК проходит через внутреннюю мембранную пору ComA и попадает в цитозоль [228]. Полученная ДНК становится доступной для включения в хромосому путем гомологичной рекомбинации системой RecA и RecBCD [229].

*Гонококковый генетический остров –
молекулярный двигатель распространения
антибиотикорезистентности N. gonorrhoeae*

Система T4SS *N. gonorrhoeae* кодируется генами GGI, который включает 66 генов и имеет длину ~59000 п.н. [209, 220, 230]. Как и все генетические острова, GGI является мобильным элементом, сам он когда-то был получен путем горизонтального переноса, о чем свидетельствует пониженный GC-состав GGI (43% при среднем составе 52% по геному *N. gonorrhoeae*) и гораздо меньшее количество DUS на единицу длины [231]. За мобильность GGI отвечает система сайт-специфической рекомбинации XerCD, способная вырезать/вставлять остров по фланкирующим сайтам difA и difB [232]. Эксперименты по анализу генов GGI, обеспечивающих функционирование T4SS, показали, что только 21 из 66 генов (*traG*, *atIA*, *traI*, *parA* и *parB*, *traK*, *traV*, *traB*, *traD*, *litX*, *yag*, *traL*, *traE*, *dsbC*, *traC*, *traW*, *traU*, *trbC*, *traN*, *traF*, *traH*) необходим для сохранения способности к секреции ДНК [209, 233, 234].

Описаны значительные вариации GGI в области генов *traG-atIA-ych-exp1-cspA-exp2* [12]. Трансмембранный белок TraG имеет три изоформы (TraG1, TraG2, TraG3), которые различаются С-концевой последовательностью, обращенной в цитоплазму, и связываются с другими компонентами T4SS [235]. Выделяют три класса GGI, которые различаются уровнем секреции ДНК во внеклеточную среду: I – *traG1+atIA*; II – *traG2+atIA*; и III – *traG3 + eppA* (класс III содержит *eppA* вместо *atIA*, ген *ych* заменен геном *ych1*, а ген *exp1* отсутствует) [235]. Изоляты с GGI класса III утратили способность секретировать

ДНК. При этом эндопептидаза EppA, функционально схожая с литической трансглюкозилазой AtIA, не обеспечивает формирования необходимого отверстия в клеточной стенке для сборки системы T4SS на мембране. Предполагается, что потеря способности секретировать ДНК связана не только с отсутствием *atIA*, но и с “плохой” аффинностью С-конца TraG3 к другим ключевым белкам GGI, таким как белок сопряжения TraD, АТРаза TraC или релаксаза TraI [220].

В отличие от двух других механизмов передачи ДНК, таких как автолиз и OMV, в ряде работ была установлена статистически значимая связь между присутствием GGI и устойчивостью к АМП на популяционном уровне. Обнаружена ассоциация между наличием GGI и увеличением доли изолятов, устойчивых к цеффиксиму, пенициллину, тетрациклину, ципрофлоксацину, со снижением доли изолятов, устойчивых к азитромицину [200]. Отмечено также, что устойчивость к азитромицину и опосредованная плазмидами устойчивость к пенициллину и тетрациклину не ассоциированы с GGI. Это вполне объяснимо, ведь GGI передает только хромосомную ДНК [236]. Сравнительный полногеномный анализ молекулярных типов возбудителя, доминирующих в России и в мире, выявил связь между снижением чувствительности изолятов *N. gonorrhoeae* к АМП и отсутствием нарушений в генах GGI, значимых для функционирования T4SS [237]. Далее на глобальной популяции *N. gonorrhoeae* сравнили распределение устойчивости к АМП среди изолятов с функциональным GGI и без GGI, а также между геномами с функциональным и нефункциональным GGI, и выявили различие между долями изолятов, устойчивых к цеффиксиму, тетрациклину, пенициллину и ципрофлоксацину [238]. При удалении из выборки изолятов с плазмидами с генами *blaTEM* и *tetM* и сравнении долей устойчивых изолятов в выборках без GGI и с функциональным GGI, доля устойчивых к пенициллину изолятов выросла с 1.2 до 2.6, а к тетрациклину – с 1.9 до 3.4. Выявленные изменения можно объяснить тем, что плазмиды передаются посредством конъюгации, а не T4SS. В то же время, доля изолятов без GGI, устойчивых к азитромицину, была выше, чем изолятов с функциональным GGI. Отметим, что при сравнении выборок с функциональным и нефункциональным GGI доля изолятов, устойчивых к азитромицину, была одинаковой. Это наблюдение может указывать на распространение устойчивости к азитромицину по иному механизму [238].

Филогенетический анализ GGI в мировой популяции гонококка выявил разделение GGI на три кластера, соответствующих описанным ранее классам [235], которые отличаются последовательностью генов *traG*, *atIA*, *ych*, *exp1*, *cspA*, *exp2*

[238]. Детальный анализ с разделением кластеров на субкластеры показал, что системы молекулярного типирования MLST и NG-MAST позволяют отнести анализируемый изолят к определенному субкластеру GGI с точностью 83 и 91%, соответственно, и сделать вывод о наличии GGI и его функциональности, а значит и о способности изолята секретировать ДНК [238].

Роль секретируемой ДНК в формировании биопленок

ДНК является важным компонентом биопленок, она стабилизирует биопленку и участвует в прикреплении клеток к клеткам. В частности, обработка ДНКазой I заметно ингибировала образование биопленок или даже приводила к их разрушению [239–241].

Образование биопленок *N. gonorrhoeae* изучено не только на штамме MS11, обладающем функциональным T4SS, но и на штаммах 1291 и FA1090, у которых нет этой системы [242]. Все три штамма способны образовывать биопленки, т.е. T4SS не является обязательным условием формирования биопленки. Однако мутант MS11 с делецией ключевого для T4SS гена *traB*, приводящей к остановке секреции оцДНК, демонстрировал существенно более медленную динамику образования биопленки с заметно худшей стабильностью [11]. оцДНК, секретируемая T4SS, играет важную роль на начальных этапах формирования биопленки, когда клетки прикрепляются к поверхности, ускоряя этот процесс, в то время как на последующих этапах больший вклад вносит дцДНК, высвобождаемая автолизом или везикулами [11].

Комменсальные *Neisseria* – резервуары генетического материала и детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к антибиотикам

На настоящий момент описаны по меньшей мере 15 комменсальных видов *Neisseria* spp., колонизирующих человека, не считая таксонов внутри полифилетических групп. Восемь из них упоминаются часто (кокковидные *N. lactamica*, *N. mucosa*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea*, *N. oralis*, *N. subflava* и палочковидные *N. elongata*, *N. bacilliformis*), а семь открыты относительно недавно (*N. bergeri*, *N. maigaei*, *N. uirgultaei*, *N. basseii*, *N. blantyrii*, *N. viridiae*, *N. benedictiae*) [243]. Комменсальные *Neisseria*, как правило, не представляют угрозы для здоровья. Они составляют значительную долю микрофлоры рото/носоглотки [244] и могут обмениваться генетическим материалом с патогенными *Neisseria*, являясь резервуаром детерминант устойчивости к АМП [245]. Около 6% всего генома

N. gonorrhoeae получено от других представителей рода *Neisseria* [245–248], вероятно, при орофарингеальной гонорее. Именно таким путем в популяции гонококка возникли мозаичные аллели гена *penA*, где донорами рекомбинантной ДНК для *N. gonorrhoeae* были *N. subflava* либо *N. cinerea* [102, 249–251]. Произошло это событие в Японии в 1990-х годах на фоне перорального потребления сублетальных концентраций цефиксима [102]. Затем штаммы с мозаичными *penA* распространялись в условиях рекомбинантной терапии цефалоспоридами [252].

Нельзя не упомянуть и о мозаичных аллелях генов оперона *mtrCDE*. Впервые такие аллели описали в 2012 году в небольшой группе изолятов из Австралии, устойчивых к азитромицину [253]. Последовательность промотора гена *mtrR* у этих штаммов гомологична последовательности из менингококкового, но не гонококкового генома (meningitidis-like). Дальнейшие исследования выявили не только изоляты *N. gonorrhoeae* с геном *mtrR* и его промотором, гомологичными *N. meningitidis*, но и изоляты *N. gonorrhoeae* в которых гены оперона *mtrCDE* были целиком или частично гомологичны *N. lactamica* и *N. polysaccharea* [133, 254].

Анализ геномов методами вычислительной филогенетики выявил ряд мутаций в генах *rplB*, *rplD* *rpsY*, которые, вероятно, возникли в результате химеризации с *N. cinerea*, *N. subflava* и *N. lactamica* [10]. Показано также, что детерминанты устойчивости к фторхинолонам в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* появились в геноме гонококка в результате горизонтального переноса [9]. Доказательства внутривидового и внутриродового горизонтального транспорта получены и для гена *porB* [8].

Барьеры для межвидового горизонтального переноса генов внутри рода *Neisseria*

Несмотря на приведенные примеры успешного межвидового горизонтального переноса ДНК, внутри рода *Neisseria* существуют определенные барьеры, препятствующие данным событиям [245]. Так, коэволюция мотивов DUS и связывающего их белка компетентности ComP способствовала возникновению “репродуктивной изоляции” между видами *Neisseria*, которая усиливается по мере их филогенетического расхождения [255]. Восемь вариантов мотивов DUS в сочетании с альтернативными формами белка ComP создают дивергентные “диалекты”, которые сильно увеличивают частоту связывания, поглощения и трансформации ДНК внутри вида по сравнению с межвидовыми взаимодействиями [256].

Другим препятствием для межвидового обмена генетическим материалом является различие в количестве и идентичности систем рестрикции-модификации у патогенных и комменсальных видов *Neisseria*. Например, *N. gonorrhoeae* может содержать от 14 до 19 таких систем, филогенетически близкая *N. lactamica* — от 14 до 17, а дальнородственная *N. elongata* — лишь 7–10 [257] (данные из базы REBASE, <http://tools.neb.com/genomes/index.php?page=N>). Эти виды по-разному модифицируют мотивы CpG и GpC, создавая видоспецифичные паттерны метилирования. На примере ДНК *N. elongata* показано, что несовпадающее метилирование приводит к расщеплению хромосомы рестриктазами и смерти клетки *N. gonorrhoeae*, которая попыталась встроить в свой геном фрагменты ДНК другого вида [258, 259]. Примечательно, что другие естественно-компетентные роды, такие как *Streptococcus*, *Helicobacter*, *Moraxella* и *Haemophilus*, также обладают большим количеством систем рестрикции-модификации [257], которые, вероятно, защищают их от попадания чужеродной ДНК и способствуют сохранению клональных линий. Впрочем, вопреки этим барьерам, межвидовая рекомбинация *in vitro* и *in vivo* отражает важность комменсальных *Neisseria*, особенно близкородственных *N. gonorrhoeae*, как резервуаров генетических вариаций и детерминант лекарственной устойчивости гонококка.

Фазовые и антигенные вариации

Фазовая вариация — это случайное обратимое переключение фазы экспрессии гена в состоянии включена/выключена, либо изменение уровня экспрессии в определенных границах [231]. Антигенная же вариация не регулирует экспрессию гена, а изменяет последовательность белка, что приводит к потенциальному появлению нескольких форм антигена (например, сдвиг рамки считывания может приводить к экспрессии трех разных продуктов). Геномы патогенных *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis* содержат в среднем 54 и 47 фазово- и антигенно-вариабельных генов соответственно [260]. Не всегда, но часто эти гены кодируют факторы патогенности, а их высокая изменчивость может быть вызвана необходимостью уходить от иммунного ответа. Так, типичными фазово- и антигенно-вариабельными локусами являются гены пилей IV типа, адгезинов, белков мутности Ора и биосинтеза LOS.

Некоторые фазовые и антигенные вариации можно наблюдать фенотипически, например, при взаимопревращении типов морфологии колоний. Культуры первичных изолятов, выделенных при острой гонорее, дают в основном вирулентные, имеющие пилы, колониальные типов Т1 и Т2. После нескольких пассажей на агаре

они утрачивают эти свойства, переходя в авирулентные типы Т3 и Т4, у которых нет пилей [261, 262], которые, впрочем, могут быть восстановлены при селективном пересеве в определенных условиях. Частота фазовых и антигенных переходов пилей (P+/P-) и белков мутности (Ора+/Ора-) может достигать 10^{-2} – 10^{-3} событий на колонию за поколение [263, 264]. При этом такая частота слишком высока, чтобы ее можно было объяснить классическими мутационными событиями.

Фазовые вариации из-за неспаривания скользящей цепи (SSM)

Большинство фазовых вариаций у *Neisseria* возникают в результате ошибок репликации нуклеотидных повторов. Данный механизм носит название “неспаривание скользящей цепи” (slipped-strand mispairing, SSM), при котором один повтор спаривается с соседним на противоположной цепи, что приводит к проскальзыванию ДНК-полимеразы. Затем в этот локус направляются белки системы репарации, после чего повтор либо вырезается, либо дублируется, при этом частота последнего события выше. В случае нарушений в системе репарации *mutS/mutL* частота фазовых вариаций может повышаться в 100–1000 раз [265]. Число нуклеотидных повторов в последовательности зависит от генетической изменчивости локуса: большее число повторов приводит к увеличению скорости изменчивости и наоборот [266]. Кроме того, чем длиннее повтор, тем меньше его копий нужно для обеспечения высокой частоты мутаций. Среди гомополимерных повторов у *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* наиболее часто встречаются (G)^{9–26} и (T)^{11–30}, а среди тандемных повторов — (GC)⁶, (CTTG)^{5–34}, (CTTCT)^{5–24}, (CAACCG)³, (GCGCGT)³, (TAGGCT)³, (CATTTCT)^{3–22} и (GCCAAGTT)^{5–25} [260].

Наиболее распространенными простыми короткими нуклеотидными повторами у микроорганизмов рода *Neisseria*, вовлеченными в процесс фазовой вариабельности, являются poly(G)-повторы, чаще всего расположенные в кодирующей области гена около 5'-конца [260, 267]. Проскальзывания в повторе приводят к сдвигу рамки считывания и трансляции дефектного белка, либо к образованию стоп-кодона и остановке трансляции. В качестве известных примеров можно привести гены пилина (*pilC*) [268], гемоглобинсвязывающих белков (*hpuA/hpuB*) [269], а также *pglA* [270] и *lgtA/lgtC/lgtD* [271], ответственных за гликозилирование пилей и биосинтез LOS соответственно. С другой стороны, если повтор находится ближе к 3'-концу, то SSM может приводить к переключению между тремя рамками считывания на

С-конце кодируемого белка, результатом которого является антигенная вариация. Например, этому подвержен полиморфный ген токсина (*mafB*) [267], который, как полагают, способствует конкуренции между видами и штаммами в пределах одной ниши [272]. Гомополимерные повторы также встречаются в промоторных областях, где SSM изменяет расстояние между положениями -10 и -35 , влияя на эффективность транскрипции. Примеры такого рода фазовых вариаций обнаружены в менингококковых генах порина (*porA*) [273] и белка внешней мембраны (*opc*) [274], а также гонококкового рецептора сидерофора (*fetA*), участвующего в поглощении железа [275].

Тандемные повторы встречаются реже гомополимерных [260, 276], среди них наиболее распространены (СТСТТ)ⁿ-повторы в генах белков мутности (*opa*). Почти в каждой из копий гена ближе к 5'-концу локализован участок СТСТТ длиной от 5 до 24 повторов. Кроме того, из-за высокого нуклеотидного сходства копии *opa* могут гомологично рекомбинировать друг с другом (генная конверсия), порождая еще больший репертуар белков мутности [277]. Встречаются также внутригенные тандемные повторы, по длине кратные трем, не приводящие к сдвигу рамки считывания, что обеспечивает генерацию структурного разнообразия белков [278]. Например, они с разной копийностью присутствуют в виде повторов длиной 15 п.н. в генах липопротеинового антигена (*lip*) [279], 24 п.н. в гене поринового канала (*pilQ*) [280] и 108 п.н. в гене деления и биосинтеза клеточной стенки (*dcaC*) [281].

Интересно, что фазовые вариации в одних генах могут влиять на эпигенетическую модификацию множества других. Тандемные повторы (AGCC)ⁿ и (CCCAA)ⁿ вызывают фазовые вариации в генах метилтрансфераз (*modA* и *modB*), соответственно, входящих в систему рестрикции-модификации типа III. Показано, что указанные выше изменения приводят к изменению паттернов метилирования в промоторах, влияя на уровень экспрессии десятков генов, формирование биопленок и взаимодействие с эпителиальными клетками человека [282, 283].

Фазовые вариации на уровне генной конверсии

Генная конверсия происходит в результате гомологичной рекомбинации схожих фрагментов ДНК, что приводит к фазовым или антигенным вариациям. Часто эти фрагменты расположены в виде генных кассет и уровень разнообразия, вносимого конверсией, зависит от числа генов в кассете и их вариабельности [284]. Генная конверсия определяет антигенную вариабельность пилей *N. gonorrhoeae*. Разбросанные по хромосоме кассеты беспромоторных усеченных генов

pilS, гомологичных гену основной субъединицы пилина *pilE*, служат для него резервуаром вариабельной генетической информации.

Геном гонококка обычно содержит четыре–пять кассет, несущих суммарно до 19 генов *pilS*, менингококка — одну кассету с четырьмя–шестью *pilS* [285]. Перенос гомологичной ДНК из копии *pilS* в экспрессирующийся *pilE* происходит независимо от RecBCD [286] за счет RecF-подобных белков (RecA), причем для события рекомбинации необходим G4-квадруплекс [42]. Частота рекомбинации в *pilE* является одной из самых высоких среди систем генной конверсии у патогенных микроорганизмов, она может достигать 6.8×10^{-3} событий на клетку за поколение, способствуя уклонению от действия иммунной системы [287].

Геномные перестройки

Известно, что порядок генов на хромосоме прокариот часто изменяется в процессе эволюции и, как правило, быстрее, чем аминокислотные последовательности, которые они кодируют [288–291]. Геномные перестройки могут происходить в результате событий гомологичной, сайт-специфической и незаконной рекомбинации: инсерций, делеций, инверсий и транслокаций. При этом частота перестроек коррелирует с состоянием систем репарации/рекомбинации и количеством мобильных элементов в геномах [291, 292]. В ходе сравнения трех геномов филогенетически удаленных молекулярных типов *N. gonorrhoeae* были выявлены крупномасштабные хромосомные перестройки [293]. Показано также, что перестройки могут происходить за относительно небольшой промежуток времени (8 недель) в лабораторных условиях под воздействием стресса (повышенной температуры и добавления сублетальной концентрации хинолонового антибиотика — налидиксовой кислоты) [294].

При этом в “горячих точках” между перестроенными фрагментами генома (синтенными блоками) обнаруживают последовательности профагов (NgoΦ1–9) и других мобильных элементов, таких как инсерционные элементы IS (IS5, IS110, IS1595) и MITE (miniature inverted-repeat transposable elements). К последним относят нейссерияльные межгенные мозаичные элементы (NIME) длиной 70–200 п.н. (в среднем 80 на геном); элементы Корреи (CREE) длиной 100–150 п.н. (126 на геном); элементы Спенсера–Смита (SSREE) длиной 650 п.н. (три на геном) [295]. Вовлеченность перечисленных мобильных элементов в процесс перестроек различна, лишь менее половины (44%) событий перестройки можно объяснить их присутствием в горячих точках [295].

Изучение взаимосвязи перестроек с филогенетической близостью *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis* показало, что количество перестроек в популяции гонококка не зависит от молекулярного типа изолята и слабо коррелирует ($\rho = 0.33$) с филогенетической близостью, тогда как у *N. meningitidis* такая корреляция существует ($\rho = 0.62$) [295]. Вероятным объяснением может быть тот факт, что популяция менингококков обладает примерно в 6 раз большим нуклеотидным разнообразием, чем популяция гонококков, которая, по-видимому, не так давно прошла через бутылочное горлышко [295].

Известно, что геномные перестройки могут влиять на экспрессию генов. Например, многие IS-элементы содержат на своих концах ориентированные наружу -35 промоторные фрагменты, поэтому вставка на правильном расстоянии от подходящего мотива -10 может привести к усилению транскрипции [296]. У представителей рода *Neisseria* роль регуляторов экспрессии могут играть элементы CREE, также фланкированные промоторными фрагментами. Подвергаясь инверсии под воздействием стресса [297] и находясь в горячих точках рекомбинации [293, 295], они способны влиять на транскрипцию близлежащих генов. Так, у *N. meningitidis* транскрипция генов эффлюкс-помпы MtrCDE управляется CREE-элементом, находящимся неподалеку от промотора [298]. Кроме того, элементы NIME, служащие сайтами для гомологичной и сайт-специфической рекомбинаций, могут способствовать как генерации новых мозаичных аллелей ближайших генов, так и протеканию фазовых и антигенных вариаций в них. Тем не менее, несмотря на приведенные примеры, влияние геномных перестроек на фенотип и экспрессию генов у *N. gonorrhoeae* и других представителей рода *Neisseria* пока остается малоизученным.

ДИАГНОСТИКА ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Микроскопическая (бактериоскопическая) диагностика

Микроскопическая диагностика основана на исследовании нативных или окрашенных препаратов в оптическом микроскопе. Анализируют отделяемое уретры у мужчин или отделяемое эндоцервикса у женщин. Мазки исследуют в два этапа: 1) окраска по Граму для сокращения списка предполагаемых возбудителей, вызывающих сходные симптомы; 2) окраска метиленовым синим или бриллиантовым зеленым с целью выявления микроорганизмов рода *Neisseria* с характерной морфологией и расположением относительно нейтрофилов и клеток эпителия

[299, 300]. К отличительным морфологическим признакам нейссерий относятся бобовидная форма и парное расположение: снаружи кокки имеют выпуклую поверхность, вогнутой стороной они обращены друг к другу. При острой инфекции в препаратах отделяемого пациентов гонококки обнаруживаются внутри нейтрофилов и на поверхности клеток плоского эпителия. В препарате, окрашенном по Граму, гонококки выглядят оранжево-красными, контрастируя с фиолетовыми ядрами лейкоцитов и клеток эпителия. В окрашенных метиленовым синим препаратах темно-синие диплококки выделяются цветом и размером на фоне голубой цитоплазмы, синих ядер эпителиальных клеток и нейтрофилов [300].

К преимуществам микроскопического метода относятся быстрота, низкая стоимость, высокая чувствительность и специфичность (>95%) анализа мазков из уретры. Основные недостатки – низкая чувствительность анализа цервикальных проб (45–65%), неприменимость для фарингеальных и ректальных проб, а также в случае ранней и бессимптомной гонореи. По этим причинам микроскопию рекомендуют применять только в совокупности с другими методами [301, 302] (рис. 5).

Культуральная (бактериологическая) диагностика

Культуральная (бактериологическая) диагностика, основанная на получении культуры *N. gonorrhoeae* с использованием селективных питательных сред с последующей идентификацией вида по биохимическим и морфологическим признакам, является золотым стандартом [301]. Для выделения культуры гонококка применяют среды Тайера–Мартина, Мартина–Льюиса, Нью-Йоркский агар. Все эти методы основаны на шоколадном агаре с добавлением различных антибиотиков, подавляющих рост грамположительных кокков, энтеробактерий и грибов. Взятые образцы немедленно высевают на предварительно прогретые до 37°C чашки с плотной питательной средой. После 24 ч инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO₂ колонии гонококка могут иметь диаметр 0.5–2.0 мм и округлую форму с блестящей поверхностью. Они могут быть как прозрачными, так и непрозрачными, бесцветными или беловатыми, иметь разную консистенцию и степень выпуклости. Наиболее характерные колонии маркируют для приготовления окрашиваемых по Граму препаратов. Микроскопически оценивают чистоту культуры, в идеале наблюдают монокультуру грамотрицательных диплококков, не образующих гроздей или цепочек, свойственных стрептококкам и стафилококкам. Посевы на чашках,

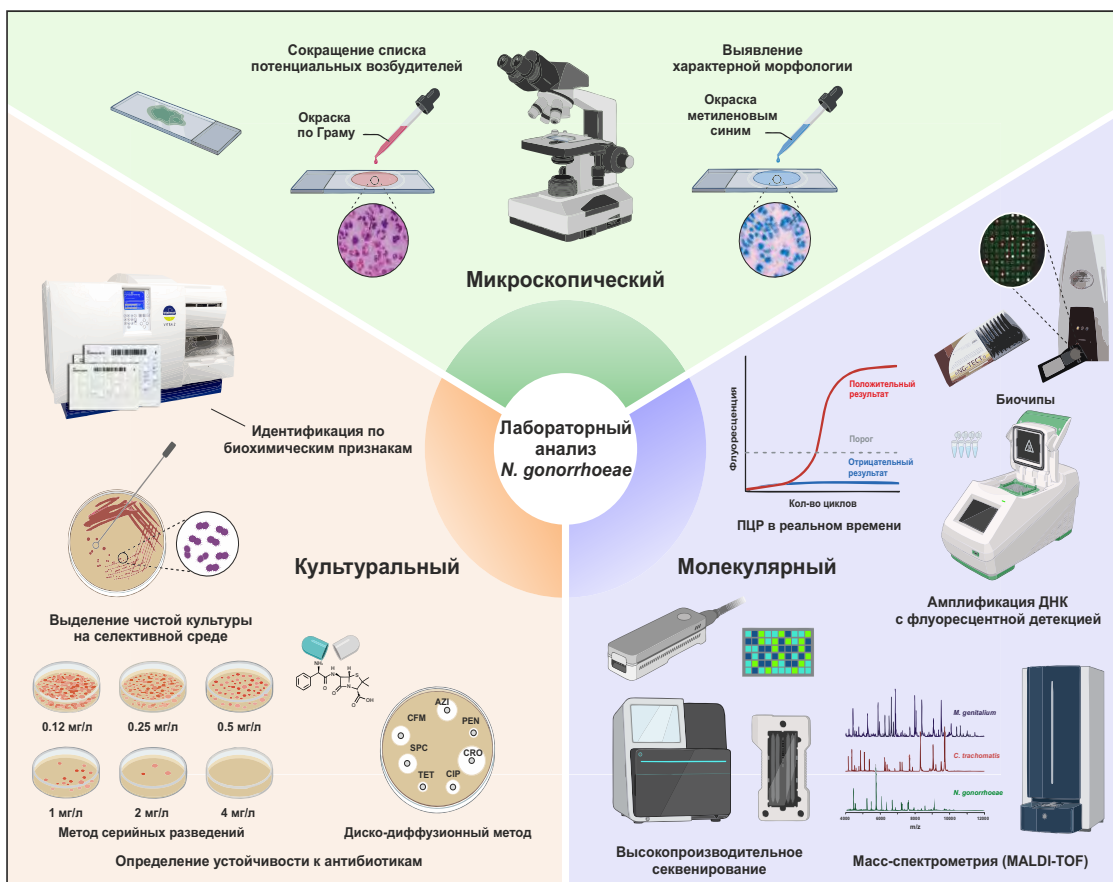


Рис. 5. Методы обнаружения *N. gonorrhoeae* в биологических образцах человека и/или определения МПК.

не давшие роста, вновь помещают в CO_2 -инкубатор. При отсутствии признаков роста через 48–72 ч инкубации наблюдение прекращают. Дополнительно измеряют МПК антибиотиков, используя либо диско-диффузионный метод, либо метод серийных разведений в агаре и др. [299, 300].

Морфологические свойства колоний *N. gonorrhoeae* могут сильно варьировать вследствие частых фазовых вариаций, что затрудняет идентификацию возбудителя. Во избежание этого проводят качественные реакции на активность оксидазы, каталазы и расщепление сахаров. Свежеприготовленный 1%-ный раствор ди- или тетраметил-*n*-фенилендиамина вступает в реакцию с *Neisseria*, окрашивая колонию в розово-фиолетовый цвет. В каталазном тесте используют 3–30%-ный пероксид водорода, обильное выделение пузырьков кислорода свидетельствует о принадлежности колонии к *Neisseria* spp. Поскольку все представители рода *Neisseria* оксидазо- и каталазоположительные, для видовой идентификации дополнительно анализируют метаболизм сахаров. В ряду

моносахаридов, которые *Neisseria* spp. могут использовать в качестве субстрата, *N. gonorrhoeae* расщепляет исключительно глюкозу [299, 300].

Кроме того, для видовой идентификации применяют коммерческие тест-системы Vitek 2 NH system (“bioMérieux”, Франция), Rapid NH system (“Thermo Fischer Scientific”, США), BBL Crystal NH ID system (“Becton Dickinson”, США). Они могут включать до нескольких десятков биохимических тестов в одной панели, что позволяет выявлять множество микроорганизмов, что важно при коинфекциях. К преимуществам бактериологического метода по сравнению с бактериоскопическим относится высокая чувствительность (80–90%) и специфичность (до 100% при видовой идентификации), а также применимость к широкому спектру образцов. Эффективность этого метода особенно важна при исследовании патологического материала, полученного из цервикального канала, экстрагенитальных очагов инфекции и при диагностике гонореи у детей [299, 300].

Молекулярная диагностика

Широкое распространение получила масс-спектрометрическая идентификация гонококка (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией, MALDI-TOF), при которой получают протеомный спектр – “отпечаток пальца”, характерный для определенного микроорганизма [303]. MALDI-TOF хорошо зарекомендовал себя для выявления гонококка, а его прогностическая значимость может достигать 99.3% [304]. Что же касается обнаружения антител к *N. gonorrhoeae*, то ни один из молекулярно-иммунологических методов не позволяет отличить текущую инфекцию от инфекций, перенесенных в прошлом. Трудности вызываются и постоянные фазовые вариации поверхностных антигенов гонококка, способствующие его уклонению от иммунного ответа. Поэтому иммунологические методы, хорошо зарекомендовавшие себя для диагностики других инфекций, передающихся половым путем (сифилиса, трихомоноза), при гонорее не используются [301].

Для выявления возбудителя гонореи применяют также молекулярно-генетические методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот возбудителя (NAAT – Nucleic Acid Amplification Technologies) с последующей флуоресцентной детекцией продуктов амплификации (например, в ходе ПЦР в реальном времени или гибридизации на микрочипах). Тесты NAAT быстры, высокочувствительны (>95%) и специфичны (>99%), их можно проводить на широком спектре клинических образцов, при этом наличие жизнеспособных бактерий не требуется [305]. Многие из тестов многопараметрические и могут выявлять сразу несколько возбудителей ИППП (например, *Chlamydia trachomatis* вместе с *N. gonorrhoeae*).

Рынок молекулярной диагностики *N. gonorrhoeae* насыщен отечественными и зарубежными NAAT-тестами, такими как COBAS AMPLICOR (“Roche Diagnostics”, Швейцария), GeneXpert CT/NG assay (“Cepheid”, США), Abbott m2000 Real Time CT/NG assay (“Abbott”, США), BD Max CT/GC/TV (“Becton Dickinson”), ГОНО-ГЕН, Андрофлор (“ДНК-Технология”, Россия), AmpliSens NG (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), ГОНОПОЛ (НПФ “ЛИТЕХ”, Россия). Мишени для идентификации возбудителя включают гены 16S рРНК, белков мутности (*opa*) и адгезина (*opcA*), цитозин-метилтрансферазы (*dcmG*), гомолога белка инверсии пилей (*pilQ*), псевдоген *porA* гонококков, гены мобильных элементов [301, 305]. Следует учитывать, что на эффективность выявления возбудителя может влиять генетическая изменчивость гонококка. Показано, что потеря или модификация ДНК-мишени снижа-

ет чувствительность теста [306, 307], тогда как на специфичность влияет наличие в образце ДНК *Neisseria* spp., а также горизонтальный перенос ДНК от *N. gonorrhoeae* к *Neisseria* spp. [308, 309]. Кроме того, ДНК гонококка может присутствовать в урогенитальных образцах в течение 2 недель после успешного лечения, приводя к ложноположительным результатам тестирования [310]. Ключевым недостатком NAAT-диагностики в сравнении с бактериологическим методом является невозможность получения фенотипических данных об устойчивости изолята к антибиотикам, для чего требуется выделение чистой культуры.

Разнообразие молекулярных детерминант лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* не позволяет рассматривать тесты на основе ПЦР как оптимальные для идентификации широкого спектра генетических маркеров резистентности к АМП. Интенсивно разрабатываются новые методы выявления детерминант устойчивости и предсказания уровня МПК на основе данных о генотипе изолята [110, 177, 311]. Особенно информативным могут быть сведения о полном геноме *N. gonorrhoeae*, полученные с использованием методов высокопроизводительного секвенирования. Полногеномный анализ с помощью как коротких (“Illumina”, США; “MGITech”, Китай), так и длинных прочтений (“Oxford Nanopore Technologies”, Великобритания), как правило, проводят, используя геномную ДНК изолятов, выращенных на специальных микробиологических средах [312]. Задачу получения геномных данных из клинических образцов *N. gonorrhoeae* без предварительного культивирования изолятов можно решить, используя процедуру целевого обогащения (target enrichment) [313], позволяющую перед секвенированием увеличить концентрацию геномов или геномных фрагментов, представляющих интерес. Процедура основана на применении биотинилированных РНК-олигонуклеотидных зондов, дающих возможность захватывать и увеличивать долю интересующих регионов путем гибридизации и выделения на магнитных частицах [313]. Вместе с тем, эффективность полногеномного анализа *N. gonorrhoeae* на клиническом материале еще предстоит установить.

Модели машинного обучения для предсказания устойчивости N. gonorrhoeae к антимикробным препаратам

Технологии машинного обучения сегодня являются глобальным направлением развития научных исследований и клинической диагностики. Предсказание устойчивости к АМП становится неотъемлемым компонентом диагностических тест-систем и эпидемиологических

баз данных. Устойчивые тенденции увеличения объема данных и развития методов их анализа дают надежду на увеличение чувствительности и специфичности предсказательных моделей.

Существующие методы предсказания устойчивости *N. gonorrhoeae* к АМП можно концептуально разделить на два класса, различающихся априорными данными о генетических детерминантах лекарственной устойчивости. В первом случае в качестве размеченных данных выступают значения МПК и сведения о выявленных детерминантах, во втором – значения МПК и весь геном патогена. Методы предсказания МПК можно подразделить на бинарные/тернарные (деление на устойчивые и чувствительные, либо устойчивые, промежуточные и чувствительные) и многоклассовые. В бинарных методах классификации, основанных на анализе известных детерминант, часто применяют логические правила и решающие деревья [314, 315]. Так, база данных Pathogenwatch (<https://pathogen.watch/genomes/all?genusId=482&speciesId=485>) содержит (на апрель 2024 г.) информацию о 38000 геномах *N. gonorrhoeae* и алгоритм предсказания устойчивости по бинарной/тернарной классификации к азитромицину, цефтриаксону, цефиксиму, ципрофлоксацину, тетрациклину, пенициллину, спектиномицину, сульфаниламидам, используя данные о генетических детерминантах резистентности, автоматически определяемых при анализе генома [314]. На тестовой выборке значения специфичности и чувствительности предсказания устойчивости *N. gonorrhoeae* к различным АМП находились в диапазонах 61.3–99.9% и 33.3–99.2% соответственно [314]. В многоклассовой классификации по известным локусам применяют прежде всего регрессию [311, 316–318].

Согласно валидированным регрессионным моделям предсказания устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином, наибольший вклад в увеличение МПК цефтриаксона внесли замены Ala501Pro, Ala311Val, Gly545Ser, вставка Asp(345–346) в PCB2, а также замена Gly120Arg в PorB [311, 316]. При сравнении моделей наибольшее значение точности и площади под кривой при ROC-анализе показано с использованием логистической регрессии, k-соседей, дерева решений и случайного леса [318].

В методах без априорного задания локусов (входными данными является последовательность полного генома) предсказание значений МПК сводится к задаче классификации или регрессии с применением методов машинного обучения. В качестве исходных данных берут набор нередуцированных перекрывающихся нуклеотидных k-меров из анализируемых геномов и значения МПК препаратов. Получают

матрицу, в которой k-меры и значения МПК рассматриваются как признаки каждого генома. Для решения задачи классификации при предсказании МПК применяется, в том числе и для *N. gonorrhoeae* [319], метод решающих списков, называемый также “машиной покрывающих множеств” (set covering machine (SCM)), и метод случайного леса (СЛ) и СЛ-регрессия. Yasir и соавт. сравнивали разные методы машинного обучения без априорного задания локусов и получили наилучшие результаты на моделях случайного леса, CATBoost и XGBoost [320]. В работе Eugene и соавт. показана неравнозначная эффективность прогностических моделей на основе машинного обучения в случае разных лекарственных препаратов, что может быть объяснено размером выборки и ее несбалансированностью [317]. Может показаться, что предпочтительными являются модели предсказания МПК, построенные не по известным детерминантам, а по k-мерам. Однако сравнение эффективности прогностических моделей с использованием геномных наборов показало, что даже при относительно больших и фенотипически сбалансированных наборах данных нельзя ожидать, что алгоритмы машинного обучения смогут успешно моделировать сложные и разнообразные механизмы резистентности, особенно учитывая, что представленность механизмов резистентности в обучающих наборах данных априори неизвестна [319].

АЛЬТЕРНАТИВА ПРИМЕНЕНИЮ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В БОРЬБЕ С ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Способность *N. gonorrhoeae* формировать устойчивость к АМП представляет глобальную угрозу и побуждает искать альтернативные методы борьбы с гонококковой инфекцией. Одним из таких подходов могла бы стать эффективная и доступная вакцина. Основные факторы, препятствующие разработке эффективной вакцины – антигенная и фазовая вариация потенциальных мишеней, а также отсутствие защитного иммунитета после инфекции. Первые попытки получить вакцину против *N. gonorrhoeae* были сделаны более 40 лет назад и стартовали с таких антигенов, как убитые клетки возбудителя [321] и пили [322]. За прошедшие годы были проанализированы антигены к компонентам внешней мембраны (PorB, Opa, OprA, OmpA, OmpU), участникам метаболизма железа (TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, FetB), цинка (TdfJ, TdfH) и анаэробного метаболизма (AniA), эффлюксной помпе (MtrE) и многим другим клеточным компонентам [323]. Подающие надежды результаты получены при использовании менингококковой вак-

цины серогруппы B4CMenB (Bexsero) [324]. 4CMenB это многокомпонентная вакцина, содержащая четыре основных иммуногенных компонента, включая нейссерияльный гепаринсвязывающий антиген (NHBA), слитый с геномным антигеном *Neisseria* GNA1030; fHbp, слитый с GNA2091; и нейссерияльный адгезин A (NadA); обработанные детергентом OMV, содержащие белок PorA в качестве основного антигена [324]. К достоинствам менингококковых OMV следует отнести растворимость и нативную форму белковых антигенов внешней мембраны [325]. Интерес к изучению антигонококкового потенциала менингококковых вакцин возник после ретроспективного исследования пациентов из Новой Зеландии [326]. В данной работе показано, что снижение частоты диагностики гонореи (эффективность вакцины 31%) связано с вакцинацией MeNZB [326] – вакциной на основе OMV, выделенных из менингококкового штамма NZ98/254 [327]. В настоящее время вакцина 4CMenB находится на II–III фазах клинических исследований. Математическое моделирование последствий использования вакцины предсказывает значительное снижение уровня заболевания гонококковой инфекцией даже при низкой эффективности вакцин [328, 329].

Альтернативный метод терапии гонококковой инфекции может исходить из механизмов межвидовой борьбы бактерий, выраженной в продукции бактериоцинов, выработке токсичных липидов, конкуренции за питательные вещества. Бактериоцины – это белковые вещества, продуцируемые одной бактерией и обладающие бактерицидной активностью против того же или родственного вида бактерий. Считается, что летальное действие бактериоцинов обусловлено их связыванием с поверхностными рецепторами с последующим взаимодействием с внутриклеточной мишенью. Ряд штаммов стафилококка содержит плазмиду вирулентности 56S, которая кодирует бактериоцин “Vas R1”. Показано, что он ингибирует рост значительного количества грамположительных бактерий, а также и *N. gonorrhoeae*. Потеря жизнеспособности 7/7 штаммов гонококка через 30 мин роста составила около 90%, а через 5 ч достигла 99.9% [330]. Показано что пиоцины – бактериоцины, вырабатываемые *P. aeruginosa*, также подавляют рост *Neisseria*, в том числе 56/56 протестированных штаммов *N. gonorrhoeae*, 3/20 *N. meningitidis* и 5/16 *N. lactamica* [331]. Гибель гонококков происходила одновременно и требовала всего одну молекулу пиоцина на колониеобразующую единицу, сопровождаясь эндогенным лизисом. Однако выяснилось, что *N. gonorrhoeae* может развивать

устойчивость к бактериоцинам *P. aeruginosa*, изменяя структуру LOS последовательными делециями и инсерциями сахаридов [332].

Исследовано подавление роста *N. gonorrhoeae in vitro* с использованием микроорганизмов, титры которых в вагинальном или цервикальном секрете превышают 10^5 КОЕ/мл. Установлено, что большинство штаммов *S. epidermidis*, *S. aureus*, меньшинство штаммов *S. viridans*, *Neisseria* spp., *Candida* и *Bifidobacterium* могут ингибировать рост гонококка [333]. Помимо этого, во влагалище обитает около 50 различных видов микроорганизмов, например *Lactobacillus*. Вырабатывая молочную кислоту, лактобациллы могут способствовать поддержанию низкого уровня pH во влагалище, что может подавлять рост других бактерий. Так, колонизация *Lactobacillus* sp., продуцирующими пероксид водорода, ассоциирована с более низкой частотой гонореи [334].

Отношения между культурами клеток облигатно-патогенных и комменсальных нейссерий далеки от благоприятных. *N. cinerea* [335] подавляет рост *N. meningitidis* в культуре эпителиальных клеток, а ДНК, выделяемая *N. elongata* и несколькими другими непатогенными видами *Neisseria*, способна убивать *N. gonorrhoeae* [258]. Aho и соавт. [336] сообщали об антимикробной активности *N. mucosa* по отношению к *N. gonorrhoeae*, хотя позднее это было опровергнуто [337]. Обнаруженная же способность *N. cinerea* подавлять рост *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae* обусловлена экспрессией системы секреции типа VI (T6SS), что не стало сюрпризом [338]. T6SS – это одна из важнейших систем межвидовой борьбы, она присутствует более чем в 25% всех грамотрицательных бактерий и способна вводить токсины как в другие бактерии, так и в эукариотические клетки [339].

Еще одной альтернативой борьбы с гонококковой инфекцией могла бы стать фаговая терапия [340, 341]. К преимуществам бактериофагов относится их нетоксичность и специфичность, а значит и отсутствие неблагоприятного влияния на микробиом человека. Сообщается об успешной терапии уропатогенной *E. coli* [342]. Основная проблемой фаговой терапии – выделение литических фагов. В 1955 году был описан полученный из смывов носоглотки человека бактериофаг, активный против ряда штаммов *N. perflava* [343]. Проверить активность этого фага в отношении *N. gonorrhoeae* не удалось, но была показана его активность в отношении *N. subflava*, *N. sicca*, *N. flavescens*, *M. catarrhalis* и *N. meningitidis* [343]. В 1967 г. выделены фаги с лизогенной активностью в отношении нескольких штаммов *N. perflava* и *N. subflava*, однако не удалось добиться эффективного лизиса

N. gonorrhoeae этими фагами [344]. В 2021 г. описали антигонококковую активность орофарингеальных и аноректальных смывов в отношении клинических штаммов *N. gonorrhoeae* [345]. Наблюдали образование фаговых бляшек, но попытка выделения антигонококкового бактериофага закончилась неудачно [345]. Таким образом фаговая терапия имеет большой потенциал, но пока еще остается темой для умозрительных рассуждений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокая генетическая пластичность позволяет *N. gonorrhoeae* формировать устойчивость ко всем терапевтическим антимикробным препаратам, что на фоне множества механизмов ускользания от иммунного ответа справедливо ставит гонококк в ряд патогенов, представляющих глобальную угрозу. Для отслеживания тенденций в развитии устойчивости к антимикробным препаратам необходим постоянный мониторинг с применением глубокого секвенирования гонококковой, менингококковой и комменсальной популяций *Neisseria* spp. Усилия, предпринимаемые на пути разработки вакцин, а также новых антимикробных препаратов и альтернативных методов терапии, оставляют надежду на возможность благоприятного прогноза развития эпидемиологической ситуации, возможного при комплексном подходе к решению вопроса о гонококковой инфекции, сочетающего не только терапию, но и профилактику.

Авторы благодарят В.С. Гоголеву за ценные замечания и предложения при обсуждении раздела “Развитие инфекции и патогенез”.

Работа выполнена при поддержке Соглашения с Министерством науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1660 на осуществление государственной поддержки создания и развития центра геномных исследований мирового уровня “Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины” ИМБ РАН в рамках реализации Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы.

Работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов изучения.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Quillin S.J., Seifert H.S. (2018) *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 226.
2. Humbert M.V., Christodoulides M. (2020) Atypical, yet not infrequent, infections with *Neisseria* species. *Pathogens.* **9**, 1.
3. Martín-Sánchez M., Ong J.J., Fairley C.K., Chen M.Y., Williamson D.A., Maddaford K., Aung E.T., Carter G., Bradshaw C.S., Chow E.P.F. (2020) Clinical presentation of asymptomatic and symptomatic heterosexual men who tested positive for urethral gonorrhoea at a sexual health clinic in Melbourne, Australia. *BMC Infect. Dis.* **20**, 486.
4. Martín-Sánchez M., Fairley C.K., Ong J.J., Maddaford K., Chen M.Y., Williamson D.A., Bradshaw C.S., Chow E.P.F. (2020) Clinical presentation of asymptomatic and symptomatic women who tested positive for genital gonorrhoea at a sexual health service in Melbourne, Australia. *Epidemiol. Infect.* **148**, e240.
5. WHO (2022) Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022–2030. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
6. Tobiason D.M., Seifert H.S. (2006) The obligate human pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, is polyploid. *PLoS Biol.* **4**, e185.
7. Tobiason D.M., Seifert H.S. (2010) Genomic content of *Neisseria* species. *J. Bacteriol.* **192**, 2160–2168.
8. Manoharan-Basil S.S., Gestels Z., Abdellati S., Akomoneh E.A., Kenyon C. (2023) Evidence of horizontal gene transfer within *porB* in 19018 whole-genome *Neisseria* spp. isolates: a global phylogenetic analysis. *Microbial Genomics.* **9**, mgen001041.
9. Manoharan-Basil S.S., González N., Laumen J.G.E., Kenyon C. (2022) Horizontal gene transfer of fluoroquinolone resistance-conferring genes from commensal *Neisseria* to *Neisseria gonorrhoeae*: a global phylogenetic analysis of 20047 isolates. *Front. Microbiol.* **13**, 793612.
10. Manoharan-Basil S.S., Laumen J.G.E., Van Dijk C., De Block T., De Baetselier I., Kenyon C. (2021) Evidence of horizontal gene transfer of 50S ribosomal genes *rplB*, *rplD*, and *rplY* in *Neisseria gonorrhoeae*. *Front. Microbiol.* **12**, 683901.
11. Zweig M., Schork S., Koerdt A., Siewering K., Sternberg C., Thormann K., Albers S.V., Molin S., van der Does C. (2014) Secreted single-stranded DNA is involved in the initial phase of biofilm formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Environ. Microbiol.* **16**, 1040–1052.
12. Dillard J.P., Seifert H.S. (2001) A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol. Microbiol.* **41**, 263–277.
13. Shaskolskiy B., Kandinov I., Dementieva E., Gryadunov D. (2022) Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: challenges in research and treatment. *Microorganisms.* **10**, 1699.

14. Golparian D., Vestberg N., Södersten W., Jacobsson S., Ohnishi M., Fang H., Bhattarai K.H., Unemo M. (2023) Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate SE690: mosaic *penA*-60.001 gene causing ceftriaxone resistance internationally has spread to the more antimicrobial-susceptible genomic lineage, Sweden, September 2022. *Euro Surveill.* **28**, 2300125.
15. Maubaret C., Camelena F., Mrimeche M., Braille A., Liberge M., Mainardis M., Guillaume C., Noel F., Bebear C., Molina J.M., Lot F., Chazelle E., Bercot B. (2023) Two cases of extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* infection combining ceftriaxone-resistance and high-level azithromycin resistance, France, November 2022 and May 2023. *Euro Surveill.* **28**, 2300456.
16. Pleininger S., Indra A., Golparian D., Heger F., Schindler S., Jacobsson S., Heidler S., Unemo M. (2022) Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* causing possible gonorrhoea treatment failure with ceftriaxone plus azithromycin in Austria, April (2022) *Euro Surveill.* **27**, 2200455.
17. Golparian D., Unemo M. (2022) Antimicrobial resistance prediction in *Neisseria gonorrhoeae*: current status and future prospects. *Expert. Rev. Mol. Diagnostics.* **22**, 29–48.
18. Unemo M., Shafer W.M. (2014) Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 587–613.
19. Jones R.A., Jerse A.E., Tang C.M. (2024) Gonococcal PorB: a multifaceted modulator of host immune responses. *Trends Microbiol.* **32**, 355–364.
20. Walker E., van Niekerk S., Hanning K., Kelton W., Hicks J. (2023) Mechanisms of host manipulation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Front. Microbiol.* **14**, 1119834.
21. Werner L.M., Alcott A., Mohlin F., Ray J.C., Belcher Dufriene M., Smirnov A., Columbus L., Blom A.M., Criss A.K. (2023) *Neisseria gonorrhoeae* co-opts C4b-binding protein to enhance complement-independent survival from neutrophils. *PLoS Pathog.* **19**, e1011055.
22. Packiam M., Wu H., Veit S.J., Mavrogiorgos N., Jerse A.E., Ingalls R.R. (2012) Protective role of Toll-like receptor 4 in experimental gonococcal infection of female mice. *Mucosal Immunol.* **5**, 19–29.
23. Mavrogiorgos N., Mekasha S., Yang Y., Kelliher M.A., Ingalls R.R. (2014) Activation of NOD receptors by *Neisseria gonorrhoeae* modulates the innate immune response. *Innate Immun.* **20**, 377–389.
24. Płaczkiwicz J., Adamczyk-Popławska M., Kozłowska E., Kwiatek A. (2022) Both *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria sicca* induce cytokine secretion by infected human cells, but only *Neisseria gonorrhoeae* upregulates the expression of long non-coding RNAs. *Pathogens.* **11**, 4.
25. Naumann M., Wessler S., Bartsch C., Wieland B., Meyer T.F. (1997) *Neisseria gonorrhoeae* epithelial cell interaction leads to the activation of the transcription factors nuclear factor kappaB and activator protein 1 and the induction of inflammatory cytokines. *J. Exp. Med.* **186**, 247–258.
26. Mendes A.C., Ciccone M., Gazolla B., Bahia D. (2020) Epithelial haven and autophagy breakout in gonococci infection. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 439.
27. Palmer A., Criss A.K. (2018) Gonococcal defenses against antimicrobial activities of neutrophils. *Trends Microbiol.* **26**, 1022–1034.
28. Escobar A., Rodas P.I., Acuña-Castillo C. (2018) Macrophage-*Neisseria gonorrhoeae* interactions: a better understanding of pathogen mechanisms of immunomodulation. *Front. Immunol.* **9**, 3044.
29. Château A., Seifert H.S. (2016) *Neisseria gonorrhoeae* survives within and modulates apoptosis and inflammatory cytokine production of human macrophages. *Cell. Microbiol.* **18**, 546–560.
30. Criss A.K., Seifert H.S. (2012) A bacterial siren song: intimate interactions between *Neisseria* and neutrophils. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 178–190.
31. Liu Y., Liu W., Russell M.W. (2014) Suppression of host adaptive immune responses by *Neisseria gonorrhoeae*: role of interleukin 10 and type 1 regulatory T cells. *Mucosal Immunol.* **7**, 165–176.
32. Liu Y., Islam E.A., Jarvis G.A., Gray-Owen S.D., Russell M.W. (2012) *Neisseria gonorrhoeae* selectively suppresses the development of Th1 and Th2 cells, and enhances Th17 cell responses, through TGF- β -dependent mechanisms. *Mucosal Immunol.* **5**, 320–331.
33. Masson L., Mlisana K., Little F., Werner L., Mkhize N.N., Ronacher K., Gamielien H., Williamson C., McKinnon L.R., Walzl G., Abdool Karim Q., Abdool Karim S.S., Passmore J.A. (2014) Defining genital tract cytokine signatures of sexually transmitted infections and bacterial vaginosis in women at high risk of HIV infection: a cross-sectional study. *Sex Transm. Infect.* **90**, 580–587.
34. Simpson S.D., Ho Y., Rice P.A., Wetzler L.M. (1999) T lymphocyte response to *Neisseria gonorrhoeae* porin in individuals with mucosal gonococcal infections. *J. Infect. Dis.* **180**, 762–773.
35. McGeachy M.J., Cua D.J., Gaffen S.L. (2019) The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity.* **50**, 892–906.
36. Craig L., Volkmann N., Arvai A.S., Pique M.E., Yeager M., Egelman Edward H., Tainer J.A. (2006) Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol. Cell.* **23**, 651–662.
37. Edwards J.L., Brown E.J., Ault K.A., Apicella M.A. (2001) The role of complement receptor 3 (CR3) in *Neisseria gonorrhoeae* infection of human cervical epithelia. *Cell. Microbiol.* **3**, 611–622.
38. Edwards J.L., Brown E.J., Uk-Nham S., Cannon J.G., Blake M.S., Apicella M.A. (2002) A co-operative interaction between *Neisseria gonorrhoeae* and complement receptor 3 mediates infection of primary cervical epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **4**, 571–584.
39. Källström H., Blackmer Gill D., Albiger B., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Jonsson A.B. (2001) Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell. Microbiol.* **3**, 133–143.

40. Edwards J.L., Apicella M.A. (2005) I-domain-containing integrins serve as pilus receptors for *Neisseria gonorrhoeae* adherence to human epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **7**, 1197–1211.
41. He Y., Zhang S., Zhang Y., Wu B., Xue Y., Ye C., Li Q., Olivia A.N., Tembo J.M., Chen H., Cai H., Chen T. (2021) Distinct patterns of host adherence by *Neisseria gonorrhoeae* isolated from experimental gonorrhea. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2021**, 7865405.
42. Cahoon L.A., Seifert H.S. (2011) Focusing homologous recombination: pilin antigenic variation in the pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* **81**, 1136–1143.
43. Craig L., Forest K.T., Maier B. (2019) Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 429–440.
44. Stern A., Meyer T.F. (1987) Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic *Neisseriae*. *Mol. Microbiol.* **1**, 5–12.
45. Bos M.P., Kao D., Hogan D.M., Grant C.C., Beland R.J. (2002) Carcinoembryonic antigen family receptor recognition by gonococcal Opa proteins requires distinct combinations of hypervariable Opa protein domains. *Infect. Immun.* **70**, 1715–1723.
46. Sadarangani M., Pollard A.J., Gray-Owen S.D. (2011) Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic *Neisseria*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 498–514.
47. Martin J.N., Ball L.M., Solomon T.L., Dewald A.H., Criss A.K., Columbus L. (2016) Neisserial Opa protein–CEACAM interactions: competition for receptors as a means of bacterial invasion and pathogenesis. *Biochemistry.* **55**, 4286–4294.
48. Alcott A.M., Werner L.M., Baiocco C.M., Belcher D.M., Columbus L., Criss A.K. (2022) Variable expression of Opa proteins by *Neisseria gonorrhoeae* influences bacterial association and phagocytic killing by human neutrophils. *J. Bacteriol.* **204**, e0003522.
49. Deo P., Chow S.H., Hay I.D., Kleifeld O., Costin A., Elgass K.D., Jiang J.H., Ramm G., Gabriel K., Dougan G., Lithgow T., Heinz E., Naderer T. (2018) Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis. *PLoS Pathog.* **14**, e1006945.
50. Gao S., Gao L., Yuan D., Lin X., van der Veen S. (2024) Gonococcal OMV-delivered PorB induces epithelial cell mitophagy. *Nat. Commun.* **15**, 1669.
51. Chen A., Seifert H.S. (2013) Structure-function studies of the *Neisseria gonorrhoeae* major outer membrane porin. *Infect. Immun.* **81**, 4383–4391.
52. Cannon J.G., Buchanan T.M., Sparling P.F. (1983) Confirmation of association of protein I serotype of *Neisseria gonorrhoeae* with ability to cause disseminated infection. *Infect. Immun.* **40**, 816–819.
53. Rechner C., Kühlewein C., Müller A., Schild H., Rudel T. (2007) Host glycoprotein Gp96 and scavenger receptor SREC interact with PorB of disseminating *Neisseria gonorrhoeae* in an epithelial invasion pathway. *Cell Host Microbe.* **2**, 393–403.
54. Ayala P., Wilbur J.S., Wetzler L.M., Tainer J.A., Snyder A., So M. (2005) The pilus and porin of *Neisseria gonorrhoeae* cooperatively induce Ca²⁺ transients in infected epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **7**, 1736–1748.
55. Ngampasutadol J., Ram S., Gulati S., Agarwal S., Li C., Visintin A., Monks B., Madico G., Rice P.A. (2008) Human factor H interacts selectively with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific complement evasion. *J. Immunol.* **180**, 3426–3435.
56. Ayala B.P., Vasquez B., Clary S., Tainer J.A., Rodland K., So M. (2001) The pilus-induced Ca²⁺ flux triggers lysosome exocytosis and increases the amount of Lamp1 accessible to *Neisseria* IgA1 protease. *Cell. Microbiol.* **3**, 265–275.
57. Lin L., Ayala P., Larson J., Mulks M., Fukuda M., Carlsson S.R., Enns C., So M. (1997) The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **24**, 1083–1094.
58. Mandrell R.E., Griffiss J.M., Macher B.A. (1988) Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes. *J. Exp. Med.* **168**, 107–126.
59. Harvey H.A., Jennings M.P., Campbell C.A., Williams R., Apicella M.A. (2001) Receptor-mediated endocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* into primary human urethral epithelial cells: the role of the asialoglycoprotein receptor. *Mol. Microbiol.* **42**, 659–672.
60. Timmerman M.M., Shao J.Q., Apicella M.A. (2005) Ultrastructural analysis of the pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* endometrial infection. *Cell. Microbiol.* **7**, 627–636.
61. Burch C.L., Danaher R.J., Stein D.C. (1997) Antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*: production of multiple lipooligosaccharides. *J. Bacteriol.* **179**, 982–986.
62. Chakraborti S., Lewis L.A., Cox A.D., St. Michael F., Li J., Rice P.A., Ram S. (2016) Phase-variable heptose I glycan extensions modulate efficacy of 2C7 vaccine antibody directed against *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *J. Immunol.* **196**, 4576–4586.
63. Mandrell R.E., Lesse A.J., Sugai J.V., Shero M., Griffiss J.M., Cole J.A., Parsons N.J., Smith H., Morse S.A., Apicella M.A. (1990) *In vitro* and *in vivo* modification of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope structure by sialylation. *J. Exp. Med.* **171**, 1649–1664.
64. John C.M., Phillips N.J., Cardenas A.J., Criss A.K., Jarvis G.A. (2023) Comparison of lipooligosaccharides from human challenge strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Front. Microbiol.* **14**, 1215946.
65. Ketterer M.R., Rice P.A., Gulati S., Kiel S., Byerly L., Fortenberry J.D., Soper D.E., Apicella M.A. (2016) Desialylation of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide by cervicovaginal microbiome sialidases:

- the potential for enhancing infectivity in men. *J. Infect. Dis.* **214**, 1621–1628.
66. Humbert M.V., Awanye A.M., Lian L.-Y., Derrick J.P., Christodoulides M. (2017) Structure of the *Neisseria* adhesin complex protein (ACP) and its role as a novel lysozyme inhibitor. *PLoS Pathog.* **13**, e1006448.
 67. Zielke R.A., Le Van A., Baarda B.I., Herrera M.F., Acosta C.J., Jerse A.E., Sikora A.E. (2018) SliC is a surface-displayed lipoprotein that is required for the anti-lysozyme strategy during *Neisseria gonorrhoeae* infection. *PLoS Pathog.* **14**, e1007081.
 68. Gulati S., Schoenhofen I.C., Whitfield D.M., Cox A.D., Li J., St. Michael F., Vinogradov E.V., Stupak J., Zheng B., Ohnishi M., Unemo M., Lewis L.A., Taylor R.E., Landig C.S., Diaz S., Reed G.W., Varki A., Rice P.A., Ram S. (2015) Utilizing CMP-sialic acid analogs to unravel *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide-mediated complement resistance and design novel therapeutics. *PLoS Pathog.* **11**, e1005290.
 69. Ram S., Sharma A.K., Simpson S.D., Gulati S., McQuillen D.P., Pangburn M.K., Rice P.A. (1998) A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* **187**, 743–752.
 70. Gulati S., Sastry K., Jensenius J.C., Rice P.A., Ram S. (2002) Regulation of the mannan-binding lectin pathway of complement on *Neisseria gonorrhoeae* by C1-inhibitor and alpha 2-macroglobulin. *J. Immunol.* **168**, 4078–4086.
 71. Ram S., Cullinane M., Blom A.M., Gulati S., McQuillen D.P., Boden R., Monks B.G., O'Connell C., Elkins C., Pangburn M.K., Dahlbäck B., Rice P.A. (2001) C4bp binding to porin mediates stable serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 423–432.
 72. Ram S., McQuillen D.P., Gulati S., Elkins C., Pangburn M.K., Rice P.A. (1998) Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* **188**, 671–680.
 73. Duensing T.D., Putten J.P. (1998) Vitronectin binds to the gonococcal adhesin OpaA through a glycosaminoglycan molecular bridge. *Biochem. J.* **334**, 133–139.
 74. Virji M. (2009) Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 274–286.
 75. Cole J.G., Fulcher N.B., Jerse A.E. (2010) Opacity proteins increase *Neisseria gonorrhoeae* fitness in the female genital tract due to a factor under ovarian control. *Infect. Immun.* **78**, 1629–1641.
 76. Virji M., Heckels J.E. (1988) Nonbactericidal antibodies against *Neisseria gonorrhoeae*: evaluation of their blocking effect on bactericidal antibodies directed against outer membrane antigens. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2703–2711.
 77. Joiner K.A., Scales R., Warren K.A., Frank M.M., Rice P.A. (1985) Mechanism of action of blocking immunoglobulin G for *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Invest.* **76**, 1765–1772.
 78. Rice P.A., Vayo H.E., Tam M.R., Blake M.S. (1986) Immunoglobulin G antibodies directed against protein III block killing of serum-resistant *Neisseria gonorrhoeae* by immune serum. *J. Exp. Med.* **164**, 1735–1748.
 79. Lewis L.A., Ram S. (2020) Complement interactions with the pathogenic *Neisseriae*: clinical features, deficiency states, and evasion mechanisms. *FEBS Lett.* **594**, 2670–2694.
 80. Ram S., Lewis L.A., Rice P.A. (2010) Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 740–780.
 81. Juneau R.A., Stevens J.S., Apicella M.A., Criss A.K. (2015) A thermonecrose of *Neisseria gonorrhoeae* enhances bacterial escape from killing by neutrophil extracellular traps. *J. Infect. Dis.* **212**, 316–324.
 82. Criss A.K., Seifert H.S. (2008) *Neisseria gonorrhoeae* suppresses the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell. Microbiol.* **10**, 2257–2270.
 83. Johnson M.B., Criss A.K. (2013) *Neisseria gonorrhoeae* phagosomes delay fusion with primary granules to enhance bacterial survival inside human neutrophils. *Cell. Microbiol.* **15**, 1323–1340.
 84. Smirnov A., Daily K.P., Gray M.C., Ragland S.A., Werner L.M., Brittany Johnson M., Eby J.C., Hewlett E.L., Taylor R.P., Criss A.K. (2023) Phagocytosis via complement receptor 3 enables microbes to evade killing by neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* **114**, 1–20.
 85. DuMont A.L., Yoong P., Day C.J., Alonzo F., McDonald W.H., Jennings M.P., Torres V.J. (2013) *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 10794–10799.
 86. van Bruggen R., Zweers D., van Diepen A., van Dissel J.T., Roos D., Verhoeven A.J., Kuijpers T.W. (2007) Complement receptor 3 and Toll-like receptor 4 act sequentially in uptake and intracellular killing of unopsonized *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by human neutrophils. *Infect. Immun.* **75**, 2655–2660.
 87. Ross G.D. (2000) Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2 – integrin glycoprotein. *Crit. Rev. Immunol.* **20** (3), 197–222.
 88. Vandendriessche S., Cambier S., Proost P., Marques P.E. (2021) Complement receptors and their role in leukocyte recruitment and phagocytosis. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 624025.
 89. Cardenas A.J., Thomas K.S., Broden M.W., Ferraro N.J., John C.M., Pires M.M., Jarvis G.A., Criss A.K. (2024) *Neisseria gonorrhoeae* scavenges host sialic acid for Siglec-mediated, complement-independent suppression of neutrophil activation. *mBio.* e0011924.
 90. Mandrell R.E. (1992) Further antigenic similarities of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharides and human glycosphingolipids. *Infect. Immun.* **60**, 3017–3020.
 91. Zughair S.M., Kandler J.L., Balthazar J.T., Shafer W.M. (2015) Phosphoethanolamine modification of *Neisseria gonorrhoeae* lipid A reduces autophagy flux in macrophages. *PLoS One.* **10**, e0144347.

92. Ortiz M.C., Lefimil C., Rodas P.I., Vernal R., Lopez M., Acuña-Castillo C., Imarai M., Escobar A. (2015) *Neisseria gonorrhoeae* modulates immunity by polarizing human macrophages to a M2 profile. *PLoS One*. **10**, e0130713.
93. Liu Y., Russell M.W. (2011) Diversion of the immune response to *Neisseria gonorrhoeae* from Th17 to Th1/Th2 by treatment with anti-transforming growth factor β antibody generates immunological memory and protective immunity. *mBio*. **2**, e00095–00011.
94. Zhu W., Tomberg J., Knilans K.J., Anderson J.E., McKinnon K.P., Sempowski G.D., Nicholas R.A., Duncan J.A. (2018) Properly folded and functional PorB from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits dendritic cell stimulation of CD4⁺ T cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **293**, 11218–11229.
95. Schmidt K.A., Schneider H., Lindstrom J.A., Boslego J.W., Warren R.A., Van De Verg L., Deal C.D., McClain J.B., Griffiss J.M. (2001) Experimental gonococcal urethritis and reinfection with homologous gonococci in male volunteers. *Sex. Transm. Dis.* **28**, 555–564.
96. Fox K.K., Thomas J.C., Weiner D.H., Davis R.H., Sparling P.F., Cohen M.S. (1999) Longitudinal evaluation of serovar-specific immunity to *Neisseria gonorrhoeae*. *Am. J. Epidemiol.* **149**, 353–358.
97. Whelan J., Abbing-Karahagopian V., Serino L., Unemo M. (2021) Gonorrhoea: a systematic review of prevalence reporting globally. *BMC Infectious Dis.* **21**, 1152.
98. Unemo M., Seifert H.S., Hook E.W., Hawkes S., Ndowa F., Dillon J.R. (2019) Gonorrhoea. *Nat. Rev. Dis. Primers*. **5**, 79.
99. Hiyama Y., Yamamoto S., Sato T., Ogasawara N., Masumori N., Takahashi S., Yokota S.I. (2024) Affinity of β -lactam antibiotics for *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 2 having wild, cefixime-reduced-susceptible, and cephalosporin (ceftriaxone)-resistant *penA* Alleles. *Microb. Drug Resist.* **30**, 141–146.
100. Zhao Y., Le W., Genco C.A., Rice P.A., Su X. (2023) Increase in multidrug resistant *Neisseria gonorrhoeae* FC428-like isolates harboring the mosaic *penA* 60.001 gene, in Nanjing, China (2017–2020). *Infect. Drug Resist.* **16**, 4053–4064.
101. Liu H., Tang K., Pham C.D., Schmerer M., Kersh E.N., Raphael B.H. (2022) Characterization of a *Neisseria gonorrhoeae* ciprofloxacin panel for an antimicrobial resistant isolate bank. *PLoS One*. **17**, e0264149.
102. Yahara K., Ma K.C., Mortimer T.D., Shimuta K., Nakayama S.I., Hirabayashi A., Suzuki M., Jinnai M., Ohya H., Kuroki T., Watanabe Y., Yasuda M., Deguchi T., Eldholm V., Harrison O.B., Maiden M.C.J., Grad Y.H., Ohnishi M. (2021) Emergence and evolution of antimicrobial resistance genes and mutations in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genome Med.* **13**, 51.
103. Zhou Q., Liu J., Chen S., Xu W., Han Y., Yin Y. (2021) The accuracy of molecular detection targeting the mutation C2611T for detecting moderate-level azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: a systematic review and meta-analysis. *Antibiotics*. **10**, 9.
104. Kivata M.W., Mbuchi M., Eyase F., Bulimo W.D., Kyanya C.K., Oundo V., Mbinda W.M., Sang W., Andagalu B., Soge O.O., McClelland R.S., Distelhorst J. (2020) Plasmid mediated penicillin and tetracycline resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Kenya. *BMC Infect. Dis.* **20**, 703.
105. Shaskolskiy B., Dementieva E., Leinsoo A., Petrova N., Chestkov A., Kubanov A., Deryabin D., Gryadunov D. (2018) Tetracycline resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Russia, 2015–2017. *Infect. Genet. Evol.* **63**, 236–242.
106. Derby A., Mekonnen D., Woldeamanuel Y., Abebe T. (2020) Azithromycin resistant gonococci: a literature review. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **9**, 138.
107. Nokchan N., Nitayanon P., Tribuddharat C. (2023) Molecular epidemiology of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their *bla(TEM-135)* gene variant in Bangkok, Thailand, 2015–(2017). *Jpn. J. Infect. Dis.* **76**, 126–134.
108. Walter de Walthoffen S. (2022) Penicillinase plasmid Australia type in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Poland. *Arch. Microbiol.* **204**, 130.
109. Thakur S.D., Levett P.N., Horsman G.B., Dillon J.R. (2018) Association of *Neisseria gonorrhoeae* genogroups and specific PBP2/MtrR/PorB mutation patterns with susceptibility to penicillin in a susceptible gonococcal population. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 2682–2686.
110. Donà V., Low N., Golparian D., Unemo M. (2017) Recent advances in the development and use of molecular tests to predict antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **17**, 845–859.
111. Unemo M., Del Rio C., Shafer W.M. (2016) Antimicrobial resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: a major global public health problem in the 21st Century. *Microbiol. Spectr.* **4**, 3.
112. Juma M., Sankaradoss A., Ndombi R., Mwaura P., Damodar T., Nazir J., Pandit A., Khurana R., Masika M., Chirchir R., Gachie J., Krishna S., Sowdhamini R., Anzala O., Meenakshi I.S. (2021) Antimicrobial resistance profiling and phylogenetic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates from Kenya in a resource-limited setting. *Front. Microbiol.* **12**, 647565.
113. Landy M., Gerstung R.B. (1945) *p*-Aminobenzoic acid synthesis by *Neisseria gonorrhoeae* in relation to clinical and cultural sulfonamide resistance. *J. Immunol.* **51**, 269–277.
114. Catlin B.W. (1989) Genetic basis of the association of sulphonamide resistance with methionine auxotrophy in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1101–1111.
115. Unemo M., Golparian D., Nicholas R., Ohnishi M., Gallay A., Sednaoui P. (2012) High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1273–1280.

116. Fedarovich A., Djordjevic K.A., Swanson S.M., Peterson Y.K., Nicholas R.A., Davies C. (2012) High-throughput screening for novel inhibitors of *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 2. *PLoS One*. **7**, e44918.
117. Chisholm S.A., Mouton J.W., Lewis D.A., Nichols T., Ison C.A., Livermore D.M. (2010) Cephalosporin MIC creep among gonococci: time for a pharmacodynamic rethink? *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2141–2148.
118. Shigemura K., Fujisawa M. (2015) History and epidemiology of antibiotic susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae*. *Curr. Drug Targets*. **16**, 272–280.
119. Cole M.J., Day M., Jacobsson S., Amato-Gauci A.J., Spiteri G., Unemo M., European Gonorrhoea Response Plan Group (2022) The European response to control and manage multi- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Euro Surveill*. **27**(18), 2100611.
120. Zapun A., Morlot C., Taha M.K. (2016) Resistance to beta-lactams in *Neisseria ssp.* due to chromosomally encoded penicillin-binding proteins. *Antibiotics*. **5**(4), 35.
121. Lopez-Arguello S., Montaner M., Marmol-Salvador A., Velazquez-Escudero A., Docobo-Perez F., Oliver A., Moya B. (2023) Penicillin-binding protein occupancy dataset for 18 beta-lactams and 4 beta-lactamase inhibitors in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiol. Spectr.* **11**, e0069223.
122. Zhao L., Liu A., Li R., Zhao S. (2018) Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and molecular characteristics of *N. gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ceftriaxone in Shandong, China, 2007 to 2014. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **51**, 52–56.
123. Кубанов А.А., Лейнсоо А.Т., Честков А.В., Деметьева Е.И., Шаскольский Б.Л., Соломка В.С., Грядунов Д.А., Дерябин Д.Г. (2017) Хромосомные детерминанты резистентности к антибиотикам и фенотипическая чувствительность к антимикробным препаратам в российской популяции *Neisseria gonorrhoeae*. *Молекуляр. биология*. **51**, 431–441.
124. Fedarovich A., Cook E., Tomberg J., Nicholas R.A., Davies C. (2014) Structural effect of the Asp345a insertion in penicillin-binding protein 2 from penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Biochemistry*. **53**, 7596–7603.
125. Osawa K., Shigemura K., Nukata Y., Kitagawa K., Yamamichi F., Yoshida H., Shirakawa T., Arakawa S., Fujisawa M. (2017) *penA*, *ponA*, *porB1*, and *mtrR* mutations and molecular epidemiological typing of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e01174-17.
126. Liao Y., Xie Q., Yin X., Li X., Xie J., Wu X., Tang S., Liu M., Zeng L., Pan Y., Yang J., Feng Z., Qin X., Zheng H. (2024) *penA* profile of *Neisseria gonorrhoeae* in Guangdong, China: novel *penA* alleles are related to decreased susceptibility to ceftriaxone or cefixime. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **63**, 107101.
127. Mahajan N., Sood S., Das B.K., Kapil A., Sreenivas V., Kar H.K., Sharma V.K. (2021) Molecular characterization of decreased susceptibility to ceftriaxone and genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in New Delhi, India. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **101**, 115423.
128. Lyu M., Ayala J.C., Chirakos I., Su C.C., Shafer W.M., Yu E.W. (2022) Structural basis of peptide-based antimicrobial inhibition of a resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0299022.
129. Handing J.W., Ragland S.A., Bharathan U.V., Criss A.K. (2018) The MtrCDE efflux pump contributes to survival of *Neisseria gonorrhoeae* from human neutrophils and their antimicrobial components. *Front. Microbiol.* **9**, 2688.
130. Kandinov I., Shaskolskiy B., Kravtsov D., Vinokurova A., Gorshkova S., Kubanov A., Solomka V., Shagabieva J., Deryabin D., Dementieva E., Gryadunov D. (2023) Azithromycin susceptibility testing and molecular investigation of *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in Russia, 2020–2021. *Antibiotics*. **12**, 170.
131. Ayala J.C., Balthazar J.T., Shafer W.M. (2022) Transcriptional regulation of the mtrCDE efflux pump operon: importance for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance. *Microbiology (Reading)*. **168**, 8.
132. Rouquette-Loughlin C.E., Reimche J.L., Balthazar J.T., Dhulipala V., Gernert K.M., Kersh E.N., Pham C.D., Pettus K., Abrams A.J., Trees D.L., St Cyr S., Shafer W.M. (2018) Mechanistic basis for decreased antimicrobial susceptibility in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* possessing a mosaic-like mtr efflux pump locus. *mBio*. **9**, 6.
133. Shafer W.M. (2018) Mosaic drug efflux gene sequences from commensal *Neisseria* can lead to low-level azithromycin resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates. *mBio*. **9**, e01747–18.
134. Ohneck E.A., Goytia M., Rouquette-Loughlin C.E., Joseph S.J., Read T.D., Jerse A.E., Shafer W.M. (2015) Overproduction of the MtrCDE efflux pump in *Neisseria gonorrhoeae* produces unexpected changes in cellular transcription patterns. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 724–726.
135. Zeth K., Kozjak-Pavlovic V., Faulstich M., Fraunholz M., Hurwitz R., Kepp O., Rudel T. (2013) Structure and function of the PorB porin from disseminating *Neisseria gonorrhoeae*. *Biochem. J.* **449**, 631–642.
136. Zhao S., Duncan M., Tomberg J., Davies C., Unemo M., Nicholas R.A. (2009) Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3744–3751.
137. Nakayama S., Tribuddharat C., Prombhul S., Shimuta K., Srifuefung S., Unemo M., Ohnishi M. (2012) Molecular analyses of *TEM* genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 916–920.
138. Elsener T.A., Jolley K.A., Sanders E., Maiden M.C.J., Cehovin A., Tang C.M. (2023) There are three major *Neisseria gonorrhoeae* beta-lactamase plasmid variants which are associated with specific lineages and carry distinct *TEM* alleles. *Microb. Genom.* **9**, mgen001057.

139. Zhao L., Liu A., Li R., Zhang Z., Jia Y., Zhao S. (2022) High prevalence of blaTEM-135 and genetic epidemiology of blaTEM-135-carrying *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Shandong, China, 2017–19. *J. Antimicrob. Chemother.* **77**, 2406–2413.
140. Phillips C.W., Aller R.D., Cohen S.N. (1976) Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet.* **2**, 960.
141. Ashford W.A., Golash R.G., Hemming V.G. (1976) Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet.* **2**, 657–658.
142. Trembizki E., Buckley C., Lawrence A., Lahra M., Whiley D. (2014) Characterization of a novel *Neisseria gonorrhoeae* penicillinase-producing plasmid isolated in Australia in (2012) *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 4984–4985.
143. Yan J., Zhang J., van der Veen S. (2019) High prevalence of TEM-135 expression from the Asian plasmid in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* from Hangzhou, China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **54**, 361–366.
144. Rim J.H., Kim H., Lee H., Yong D., Jeong S.H., Lee K. (2018) Recent increase in the incidence of TEM-135 beta-lactamase-harboring *Neisseria gonorrhoeae* in Korea. *Ann. Lab. Med.* **38**, 324–330.
145. Ropp P.A., Hu M., Olesky M., Nicholas R.A. (2002) Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 769–777.
146. Nguyen F., Starosta A.L., Arenz S., Sohmen D., Dönhöfer A., Wilson D.N. (2014) Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.* **395**, 559–575.
147. Mortimer T.D., Grad Y.H. (2023) A genomic perspective on the near-term impact of doxycycline post-exposure prophylaxis on *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance. *Clin. Infect. Dis.* **77**, 788–791.
148. Mortimer T.D., Zhang J.J., Ma K.C., Grad Y.H. (2022) Loci for prediction of penicillin and tetracycline susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae*: a genome-wide association study. *Lancet. Microbe.* **3**, e376–e381.
149. Yee W.X., Elsener T., Cehovin A., Maiden M.C.J., Tang C.M. (2023) Evolution and exchange of plasmids in pathogenic *Neisseria. mSphere.* **8**, e0044123.
150. Pachulec E., van der Does C. (2010) Conjugative plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS One.* **5**, e9962.
151. Shaskolskiy B., Dementieva E., Kandinov I., Filippova M., Petrova N., Plakhova X., Chestkov A., Kubanov A., Deryabin D., Gryadunov D. (2019) Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin and ceftriaxone) in Russia, 2015–(2017) *PLoS One.* **14**, e0220339.
152. Sanchez-Buso L., Cole M.J., Spiteri G., Day M., Jacobsson S., Golparian D., Sajedi N., Yeats C.A., Abudahab K., Underwood A., Bluemel B., Aanensen D.M., Unemo M. (2022) Europe-wide expansion and eradication of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* lineages: a genomic surveillance study. *Lancet Microbe.* **3**, e452–e463.
153. Kubanov A., Solomka V., Plakhova X., Chestkov A., Petrova N., Shaskolskiy B., Dementieva E., Leinsoo A., Gryadunov D., Deryabin D. (2019) Summary and trends of the Russian Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme, 2005 to 2016. *J. Clin. Microbiol.* **57**, 6.
154. Maness M.J., Foster G.C., Sparling P.F. (1974) Ribosomal resistance to streptomycin and spectinomycin in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **120**, 1293–1299.
155. Iliina E.N., Malakhova M.V., Bodoev I.N., Oparina N.Y., Filimonova A.V., Govorun V.M. (2013) Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Front. Microbiol.* **4**, 186.
156. Барышков К.В., Фриго Н.В., Соломка В.С. (2013) Молекулярный мониторинг и определение чувствительности *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам как инструменты контроля над распространением гонококковой инфекции в Архангельской области. *Вест. дерматол. венерол.* **89**, 52–62.
157. Ison C.A., Littleton K., Shannon K.P., Easmon C.S., Phillips I. (1983) Spectinomycin resistant gonococci. *Brit. Med. J.* **287**, 1827–1829.
158. Chen S.C., Hu L.H., Zhu X.Y., Yin Y.P. (2020) Gonococcal urethritis caused by a multidrug resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain with high-level resistance to spectinomycin in China. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 517–519.
159. Heddle J., Maxwell A. (2002) Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1805–1815.
160. Golparian D., Jacobsson S., Sanchez-Buso L., Bazzo M.L., Lan P.T., Galarza P., Ohnishi M., Unemo M. (2022) GyrB *in silico* mining in 27 151 global gonococcal genomes from 1928–2021 combined with zoliflodacin *in vitro* testing of 71 international gonococcal isolates with different GyrB, ParC and ParE substitutions confirms high susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **78**, 150–154.
161. Thomas J., Sullivan T., Doyle L.J., Dixon P., Winterscheid K., Ehret J.M., Grabenstein M., Bowers S., Pettus K., Parekh M., Knapp J. (2007) Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. *Morbidity Mortality Weekly Rep.* **56**, 332–336.
162. Chisholm S.A., Dave J., Ison C.A. (2010) High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3812–3816.
163. Lin X., Chen W., Yu Y., Lan Y., Xie Q., Liao Y., Wu X., Tang S., Qin X., Zheng H. (2022) Emergence and genomic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with high levels of ceftriaxone and azithromycin resistance in Guangdong, China, from 2016 to 2019. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0157022.
164. Gianecini R.A., Poklepovich T., Golparian D., Cuenca N., Scocozza L., Bergese S., Canigia L.F., Vilches V., Lazzarino Elgart M.J., Unemo M., Campos J., Galarza P. (2023) Sustained transmission of

- Neisseria gonorrhoeae* strains with high-level azithromycin resistance (MIC \geq 256 $\mu\text{g/mL}$) in Argentina, 2018 to 2022. *Microbiol. Spectr.* **11**, e0097023.
165. Cousin S., Whittington W.L., Roberts M.C. (2003) Acquired macrolide resistance genes in pathogenic *Neisseria* spp. isolated between 1940 and 1987. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3877–3880.
166. Belkacem A., Jacquier H., Goubard A., Mougari F., La Ruche G., Patey O., Micaelo M., Semaille C., Cambau E., Bercot B. (2016) Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013–14. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2471–2478.
167. Bignell C., Fitzgerald M., Guideline Development Group, British Association for Sexual Health and HIV UK (2011) UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int. J. STD AIDS.* **22**, 541–547.
168. Mlynarczyk-Bonikowska B., Kowalewski C., Krolak-Ulinska A., Marusza W. (2022) Molecular mechanisms of drug resistance and epidemiology of multi-drug-resistant variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 10499.
169. Beggs G.A., Ayala J.C., Kavanaugh L.G., Read T.D., Hooks G.M., Schumacher M.A., Shafer W.M., Brennan R.G. (2021) Structures of *Neisseria gonorrhoeae* MtrR-operator complexes reveal molecular mechanisms of DNA recognition and antibiotic resistance-conferring clinical mutations. *Nucl. Acids Res.* **49**, 4155–4170.
170. Joseph S.J., Thomas J.C., Schmerer M.W., Cartee J.C., St Cyr S., Schlanger K., Kersh E.N., Raphael B.H., Gernert K.M., Antimicrobial Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Working Group (2022) Global emergence and dissemination of *Neisseria gonorrhoeae* ST-9363 isolates with reduced susceptibility to azithromycin. *Genome Biol. Evol.* **14**, evab287.
171. Unemo M., Ross J., Serwin A.B., Gomberg M., Cusini M., Jensen J.S. (2020) 2020 European guideline for the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int. J. STD AIDS.* 956462420949126. doi: 10.1177/0956462420949126.
172. Ghanem K.G., Erbeling E.J., Cheng W.W., Rompalo A.M. (2006) Doxycycline compared with benzathine penicillin for the treatment of early syphilis. *Clin. Infect. Dis.* **42**, e45–9.
173. Bala M., Kakran M., Singh V., Sood S., Ramesh V., Members of WHO GASP SEAR Network (2013) Monitoring antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in selected countries of the WHO South-East Asia Region between 2009 and 2012: a retrospective analysis. *Sex. Transm. Infect.* **89**(Suppl 4), iv28–35.
174. Cole M.J., Spiteri G., Jacobsson S., Pitt R., Grigorjev V., Unemo M., Euro-GASP Network (2015) Is the tide turning again for cephalosporin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in Europe? Results from the 2013 European surveillance. *BMC Infect. Dis.* **15**, 321.
175. Dillon J.A., Trecker M.A., Thakur S.D., Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program Network in Latin America and Caribbean (2013) Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. *Sex. Transm. Infect.* **89**, 36–41.
176. Golparian D., Pleininger S., Jacobsson S., Indra A., Unemo M. (2022) Complete reference genome sequence of the extensively drug-resistant strain *Neisseria gonorrhoeae* AT159, with ceftriaxone resistance and high-level azithromycin resistance, using nanopore Q20+ chemistry and illumina sequencing. *Microbiol. Res. Announ.* **11**, e0074422.
177. Shaskolskiy B., Kandinov I., Kravtsov D., Vinokurova A., Gorshkova S., Filippova M., Kubanov A., Solomka V., Deryabin D., Dementieva E., Gryadunov D. (2021) Hydrogel droplet microarray for genotyping antimicrobial resistance determinants in *Neisseria gonorrhoeae* isolates. *Polymers.* **13**, 3889.
178. Kandinov I., Dementieva E., Filippova M., Vinokurova A., Gorshkova S., Kubanov A., Solomka V., Shagabieva J., Deryabin D., Shaskolskiy B., Gryadunov D. (2023) Emergence of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates belonging to the NG-MAST genogroup 12302 in Russia. *Microorganisms.* **11**, 1226.
179. Unemo M., Jensen J.S. (2017) Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: gonorrhoea and *Mycoplasma genitalium*. *Nat. Rev. Urol.* **14**, 139–152.
180. Tanaka M., Furuya R., Kobayashi I., Ohno A., Kanesaka I. (2021) Molecular characteristics and antimicrobial susceptibility of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Fukuoka, Japan, 1996–2018. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **26**, 45–51.
181. Zhang L., Hu L., Li Y., Xiu L., Wang D., Huang J., Gu W., Peng J. (2023) Identification of high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with diverse *penA* alleles in Zhejiang, China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **35**, 51–55.
182. Demczuk W., Sidhu S., Unemo M., Whiley D.M., Allen V.G., Dillon J.R., Cole M., Seah C., Trembizki E., Trees D.L., Kersh E.N., Abrams A.J., de Vries H.J.C., van Dam A.P., Medina I., Bharat A., Mulvey M.R., Van Domselaar G., Martin I. (2017) *Neisseria gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance, a novel antimicrobial resistance multilocus typing scheme for tracking global dissemination of *N. gonorrhoeae* strains. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1454–1468.
183. Ohnishi M., Golparian D., Shimuta K., Saika T., Hoshina S., Iwasaku K., Nakayama S., Kitawaki J., Unemo M. (2011) Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3538–3545.
184. Day M.J., Spiteri G., Jacobsson S., Woodford N., Amato-Gauci A.J., Cole M.J., Unemo M., Euro-GASP network (2018). Stably high azithromycin resistance and decreasing ceftriaxone susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 25 European countries, 2016. *BMC Infect. Dis.* **18**, 609.
185. Muhammad I., Golparian D., Dillon J.A., Johansson A., Ohnishi M., Sethi S., Chen S.C., Nakayama S., Sundqvist M., Bala M., Unemo M. (2014) Characteri-

- sation of *blaTEM* genes and types of beta-lactamase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* – the prevalent and conserved *blaTEM-135* has not recently evolved and existed in the Toronto plasmid from the origin. *BMC Infect. Dis.* **14**, 454.
186. Kandinov I., Gryadunov D., Vinokurova A., Antonova O., Kubanov A., Solomka V., Shagabieva J., Deryabin D., Shaskolskiy B. (2022) *In vitro* susceptibility to beta-lactam antibiotics and viability of *Neisseria gonorrhoeae* strains producing plasmid-mediated broad- and extended-spectrum beta-lactamases. *Front. Microbiol.* **13**, 896607.
187. WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae* (2016). Geneva, Switzerland: World Health Organization.
188. Bradford P.A., Miller A.A., O'Donnell J., Mueller J.P. (2020) Zoliflodacin: an oral spiropyrimidinetrione antibiotic for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*, including multi-drug-resistant isolates. *ACS Infect. Dis.* **6**, 1332–1345.
189. Chen M.Y., McNulty A., Avery A., Whiley D., Tabrizi S.N., Hardy D., Das A.F., Nenninger A., Fairley C.K., Hocking J.S., Bradshaw C.S., Donovan B., Howden B.P., Oldach D., Solitaire U.T. (2019) Solithromycin versus ceftriaxone plus azithromycin for the treatment of uncomplicated genital gonorrhoea (SOLITAIRE-U): a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet. Infect. Dis.* **19**, 833–842.
190. Scangarella-Oman N.E., Dixon P., Koeth L.M., DiFranco-Fisher J., Miller L.A. (2021) Analysis of antimicrobial susceptibility testing methods and variables and *in vitro* activity of gepotidacin against urogenital *Neisseria gonorrhoeae* in men. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **101**, 115484.
191. Lewis D.A. (2019) New treatment options for *Neisseria gonorrhoeae* in the era of emerging antimicrobial resistance. *Sex. Health.* **16**, 449–456.
192. Abdellati S., Laumen J.G.E., de Block T., De Baetselier I., Van Den Bossche D., Van Dijk C., Manoharan-Basil S.S., Kenyon C. (2024) Gonococcal resistance to zoliflodacin could emerge via transformation from commensal *Neisseria* species. An *in vitro* transformation study. *Sci. Rep.* **14**, 1179.
193. Unemo M., Ahlstrand J., Sanchez-Buso L., Day M., Aanensen D., Golparian D., Jacobsson S., Cole M.J., European Collaborative Group (2021) High susceptibility to zoliflodacin and conserved target (GyrB) for zoliflodacin among 1209 consecutive clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates from 25 European countries, 2018. *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 1221–1228.
194. Golparian D., Jacobsson S., Ohnishi M., Unemo M. (2023) Complete reference genome sequence of the clinical *Neisseria gonorrhoeae* strain H035, with resistance to the novel antimicrobial zoliflodacin, identified in Japan in 2000. *Microbiol. Res. Announc.* **12**, e0113022.
195. Martin I.M., Ison C.A., Aanensen D.M., Fenton K.A., Spratt B.G. (2004) Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* **189**, 1497–1505.
196. Cartee J.C., Joseph S.J., Weston E., Pham C.D., Thomas J.C., Schlanger K., St Cyr S.B., Farley M.M., Moore A.E., Tunalı A.K., Cloud C., Raphael B.H. (2022) Phylogenomic comparison of *Neisseria gonorrhoeae* causing disseminated gonococcal infections and uncomplicated gonorrhoea in Georgia, United States. *Open Forum Infect. Dis.* **9**, ofac247.
197. Sun A., Fan X., Gu Y., Du P., Tang R., Mao Y., Lin X., Yan J. (2010) Predominant *porB1A* and *porB1B* genotypes and correlation of gene mutations with drug resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Eastern China. *BMC Infect. Dis.* **10**, 323.
198. Schaeffer J., Lippert K., Pleininger S., Stoger A., Hasenberger P., Stadlbauer S., Heger F., Eigentler A., Geusau A., Indra A., Allerberger F., Ruppitsch W. (2022) Association of phylogenomic relatedness among *Neisseria gonorrhoeae* strains with antimicrobial resistance, Austria, 2016–2020. *Emerging Infect. Dis.* **28**, 1694–1698.
199. Golparian D., Sanchez-Buso L., Cole M., Unemo M. (2021) *Neisseria gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance (NG-STAR) clonal complexes are consistent with genomic phylogeny and provide simple nomenclature, rapid visualization and antimicrobial resistance (AMR) lineage predictions. *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 940–944.
200. Harrison O.B., Clemence M., Dillard J.P., Tang C.M., Trees D., Grad Y.H., Maiden M.C. (2016) Genomic analyses of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an association of the gonococcal genetic island with antimicrobial resistance. *J. Infection.* **73**, 578–587.
201. Harrison O.B., Cehovin A., Skett J., Jolley K.A., Massari P., Genco C.A., Tang C.M., Maiden M.C. (2020) *Neisseria gonorrhoeae* population genomics: use of the gonococcal core genome to improve surveillance of antimicrobial resistance. *J. Infect. Dis.* **222**, 1816–1825.
202. Golparian D., Dona V., Sanchez-Buso L., Foerster S., Harris S., Endimiani A., Low N., Unemo M. (2018) Antimicrobial resistance prediction and phylogenetic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using the Oxford nanopore MinION sequencer. *Sci. Rep.* **8**, 17596.
203. Koomey M. (1998) Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: a model system for studies of horizontal gene transfer. *APMIS Suppl.* **84**, 56–61.
204. Norlander L., Davies J., Normark S. (1979) Genetic exchange mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **138**, 756–761.
205. Hamilton H.L., Dillard J.P. (2006) Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol. Microbiol.* **59**, 376–385.
206. Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claviers J.P. (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 181–196.
207. Lorenz M.G., Wackernagel W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**, 563–602.

208. Sparling P.F. (1966) Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* **92**, 1364–1371.
209. Hamilton H.L., Domínguez N.M., Schwartz K.J., Hackett K.T., Dillard J.P. (2005) *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **55**, 1704–1721.
210. Goodman S.D., Scocca J.J. (1988) Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 6982–6986.
211. Zhang Y., Heidrich N., Ampattu B.J., Gunderson C.W., Seifert H.S., Schoen C., Vogel J., Sontheimer E.J. (2013) Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Cell.* **50**, 488–503.
212. Hebel B.H., Young F.E. (1975) Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **122**, 385–392.
213. Morse S.A., Bartenstein L. (1974) Factors affecting autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145**, 1418–1421.
214. Morse S.A., Cacciapuoti A.F., Lysko P.G. (1979) Physiology of *Neisseria gonorrhoeae*. *Adv. Microb. Physiol.* **20**, 251–320.
215. Hebel B.H., Young F.E. (1976) Mechanism of autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **126**, 1186–1193.
216. Garcia D.L., Dillard J.P. (2006) AmiC functions as an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase necessary for cell separation and can promote autolysis in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **188**, 7211–7221.
217. Chan Y.A., Hackett K.T., Dillard J.P. (2012) The lytic transglycosylases of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microb. Drug Resist.* **18**, 271–279.
218. Dhital S., Deo P., Bharathwaj M., Horan K., Nickson J., Azad M., Stuart I., Chow S.H., Gunasinghe S.D., Bamert R., Li J., Lithgow T., Howden B.P., Naderer T. (2022) *Neisseria gonorrhoeae*-derived outer membrane vesicles package β -lactamases to promote antibiotic resistance. *microLife.* **3**, uqac013.
219. Dorward D.W., Garon C.F., Judd R.C. (1989) Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **171**, 2499–2505.
220. Callaghan M.M., Heilers J.H., van der Does C., Dillard J.P. (2017) Secretion of chromosomal DNA by the *Neisseria gonorrhoeae* type IV secretion system. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **413**, 323–345.
221. Ryan M.E., Damke P.P., Shaffer C.L. (2023) DNA transport through the dynamic type IV secretion system. *Infect. Immun.* **91**, e0043622.
222. Koch B., Callaghan M.M., Tellechea-Luzardo J., Seeger A.Y., Dillard J.P., Krasnogor N. (2020) Protein interactions within and between two F-type type IV secretion systems. *Mol. Microbiol.* **114**, 823–838.
223. Bignell C., Thomas C.M. (2001) The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J. Biotechnol.* **91**, 1–34.
224. Callaghan M.M., Koch B., Hackett K.T., Klimowicz A.K., Schaub R.E., Krasnogor N., Dillard J.P. (2021) Expression, localization, and protein interactions of the partitioning proteins in the gonococcal type IV secretion system. *Front. Microbiol.* **12**, 784483.
225. Heilers J.H., Reiners J., Heller E.M., Golzer A., Smits S.H.J., van der Does C. (2019) DNA processing by the MOBH family relaxase TraI encoded within the gonococcal genetic island. *Nucl. Acids Res.* **47**, 8136–8153.
226. Salgado-Pabón W., Jain S., Turner N., van der Does C., Dillard J.P. (2007) A novel relaxase homologue is involved in chromosomal DNA processing for type IV secretion in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **66**, 930–947.
227. Gangel H., Hepp C., Müller S., Oldewurtel E.R., Aas F.E., Koomey M., Maier B. (2014) Concerted spatio-temporal dynamics of imported DNA and ComE DNA uptake protein during gonococcal transformation. *PLoS Pathog.* **10**, e1004043.
228. Krüger N.J., Stingl K. (2011) Two steps away from novelty – principles of bacterial DNA uptake. *Mol. Microbiol.* **80**, 860–867.
229. Mehr I.J., Seifert H.S. (1998) Differential roles of homologous recombination pathways in *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation, DNA transformation and DNA repair. *Mol. Microbiol.* **30**, 697–710.
230. Callaghan M.M., Klimowicz A.K., Shockey A.C., Kane J., Pepperell C.S., Dillard J.P. (2021) Transcriptional and translational responsiveness of the *Neisseria gonorrhoeae* type IV secretion system to conditions of host infections. *Infect. Immun.* **89**, e0051921.
231. Rotman E., Seifert H.S. (2014) The genetics of *Neisseria* species. *Annu. Rev. Genet.* **48**, 405–431.
232. Domínguez N.M., Hackett K.T., Dillard J.P. (2011) XerCD-mediated site-specific recombination leads to loss of the 57-kilobase gonococcal genetic island. *J. Bacteriol.* **193**, 377–388.
233. Hamilton H.L., Schwartz K.J., Dillard J.P. (2001) Insertion-duplication mutagenesis of neisseria: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. *J. Bacteriol.* **183**, 4718–4726.
234. Pachulec E., Siewering K., Bender T., Heller E.M., Salgado-Pabon W., Schmoller S.K., Woodhams K.L., Dillard J.P., van der Does C. (2014) Functional analysis of the gonococcal genetic island of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS One.* **9**, e109613.
235. Kohler P.L., Chan Y.A., Hackett K.T., Turner N., Hamilton H.L., Cloud-Hansen K.A., Dillard J.P. (2013) Mating pair formation homologue TraG is a variable membrane protein essential for contact-independent type IV secretion of chromosomal DNA by *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **195**(8), 1666–1679.
236. Zhang D., Hu M., Chi S., Chen H., Lin C., Yu F., Zheng Z. (2022) Molecular characteristics and gonococcal genetic island carrying status of thirty-seven *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Eastern China. *Infect. Drug Resist.* **15**, 6545–6553.
237. Shaskolskiy B., Kravtsov D., Kandinov I., Gorskova S., Kubanov A., Solomka V., Deryabin D., Dementieva E., Gryadunov D. (2022) Comparative whole-genome analysis of *Neisseria gonorrhoeae*

- isolates revealed changes in the gonococcal genetic island and specific genes as a link to antimicrobial resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 831336.
238. Kravtsov D., Gryadunov D., Shaskolskiy B. (2023) Gonococcal genetic island in the global *Neisseria gonorrhoeae* population: a model of genetic diversity and association with resistance to antimicrobials. *Microorganisms*. **11**, 1547.
239. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. **295**, 1487.
240. Harmsen M., Lappann M., Knöchel S., Molin S. (2010) Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2271–2279.
241. Lappann M., Claus H., van Alen T., Harmsen M., Elias J., Molin S., Vogel U. (2010) A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **75**, 1355–1371.
242. Greiner L.L., Edwards J.L., Shao J., Rabinak C., Entz D., Apicella M.A. (2005) Biofilm formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **73**, 1964–1970.
243. Diallo K., MacLennan J., Harrison O.B., Msefula C., Sow S.O., Daugla D.M., Johnson E., Trotter C., MacLennan C.A., Parkhill J., Borrow R., Greenwood B.M., Maiden M.C. (2019) Genomic characterization of novel *Neisseria* species. *Sci. Rep.* **9**, 13742.
244. Burcham Z.M., Garneau N.L., Comstock S.S., Tucker R.M., Knight R., Metcalf J.L. (2020) Patterns of oral microbiota diversity in adults and children: a crowdsourced population study. *Sci. Rep.* **10**, 2133.
245. Goytia M., Wadsworth C.B. (2022) Canary in the coal mine: how resistance surveillance in commensals could help curb the spread of AMR in pathogenic *Neisseria*. *mBio*. **13**, e0199122.
246. Hanage W.P., Fraser C., Spratt B.G. (2005) Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.* **3**, 6.
247. Grad Y.H., Harris S.R., Kirkcaldy R.D., Green A.G., Marks D.S., Bentley S.D., Trees D., Lipsitch M. (2016) Genomic epidemiology of gonococcal resistance to extended-spectrum cephalosporins, macrolides, and fluoroquinolones in the United States, 2000–2013. *J. Infect. Dis.* **214**, 1579–1587.
248. Arnold B., Sohail M., Wadsworth C., Corander J., Hanage W.P., Sunyaev S., Grad Y.H. (2020) Fine-scale haplotype structure reveals strong signatures of positive selection in a recombining bacterial pathogen. *Mol. Biol. Evol.* **37**, 417–428.
249. Igawa G., Yamagishi Y., Lee K.I., Dorin M., Shimuta K., Suematsu H., Nakayama S.I., Mikamo H., Unemo M., Ohnishi M. (2018) *Neisseria cinerea* with high ceftriaxone MIC is a source of ceftriaxone and cefixime resistance-mediating *penA* sequences in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, 3.
250. Kanesaka I., Ohno A., Katsuse A.K., Takahashi H., Kobayashi I. (2022) The emergence of the ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone by transfer of resistance from an oral *Neisseria subflava* reservoir of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **77**, 364–373.
251. Unitt A., Maiden M., Harrison O. (2024) Characterizing the diversity and commensal origins of *penA* mosaicism in the genus *Neisseria*. *Microb. Genom.* **10**, mgen001209.
252. Shimuta K., Watanabe Y., Nakayama S., Morita-Ishihara T., Kuroki T., Unemo M., Ohnishi M. (2015) Emergence and evolution of internationally disseminated cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clones from 1995 to 2005 in Japan. *BMC Infect. Dis.* **15**, 378.
253. Trembizki E., Doyle C., Jennison A., Smith H., Bates J., Lahra M., Whiley D. (2014) A *Neisseria gonorrhoeae* strain with a meningococcal *mtrR* sequence. *J. Med. Microbiol.* **63**, 1113–1115.
254. Wadsworth C.B., Arnold B.J., Sater M.R.A., Grad Y.H. (2018) Azithromycin resistance through inter-specific acquisition of an epistasis-dependent efflux pump component and transcriptional regulator in *Neisseria gonorrhoeae*. *mBio*. **9**, 4.
255. Cehovin A., Simpson P.J., McDowell M.A., Brown D.R., Noschese R., Pallett M., Brady J., Baldwin G.S., Lea S.M., Matthews S.J., Pelicic V. (2013) Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 3065–3070.
256. Frye S.A., Nilsen M., Tønjum T., Ambur O.H. (2013) Dialects of the DNA uptake sequence in *Neisseriaceae*. *PLoS Genet.* **9**, e1003458.
257. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. (2023) REBASE: a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucl. Acids Res.* **51**, D629–D630.
258. Kim W.J., Higashi D., Goytia M., Rendón M.A., Pilligua-Lucas M., Bronnimann M., McLean J.A., Duncan J., Trees D., Jerse A.E., So M. (2019) Commensal *Neisseria* kill *Neisseria gonorrhoeae* through a DNA-dependent mechanism. *Cell Host Microbe*. **26**, 228–239.
259. So M., Rendón M.A. (2019) Tribal warfare: commensal *Neisseria* kill pathogen *Neisseria gonorrhoeae* using its DNA. *Microb. Cell*. **6**, 54–546.
260. Wanford J.J., Green L.R., Aidley J., Bayliss C.D. (2018) Phasome analysis of pathogenic and commensal *Neisseria* species expands the known repertoire of phase variable genes, and highlights common adaptive strategies. *PLoS One*. **13**, e0196675.
261. Kellogg D.S., Peacock W.L., Deacon W.E., Brown L., Pirkle D.I. (1963) *Neisseria gonorrhoeae*. I. virulence genetically linked to clonal variation. *J. Bacteriol.* **85**, 1274–1279.
262. Heckels J.E. (2019) Gonococcal colony typing. *Meth. Mol. Biol.* **1997**, 77–85.
263. Mayer L.W. (1982) Rates *in vitro* changes of gonococcal colony opacity phenotypes. *Infect. Immun.* **37**, 481–485.
264. Sparling P.F., Cannon J.G., So M. (1986) Phase and antigenic variation of pili and outer membrane protein II of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Infect. Dis.* **153**, 196–201.
265. Criss A.K., Bonney K.M., Chang R.A., Duffin P.M., LeCuyer B.E., Seifert H.S. (2010) Mismatch correction modulates mutation frequency and pilus phase

- and antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **192**, 316–325.
266. De Bolle X., Bayliss C.D., Field D., van de Ven T., Saunders N.J., Hood D.W., Moxon E.R. (2000) The length of a tetranucleotide repeat tract in *Haemophilus influenzae* determines the phase variation rate of a gene with homology to type III DNA methyltransferases. *Mol. Microbiol.* **35**, 211–222.
267. Zelewska M.A., Pulijala M., Spencer-Smith R., Mahmood H.A., Norman B., Churchward C.P., Calder A., Snyder L.A.S. (2016) Phase variable DNA repeats in *Neisseria gonorrhoeae* influence transcription, translation, and protein sequence variation. *Microb. Genom.* **2**, e000078.
268. Jonsson A.B., Nyberg G., Normark S. (1991). Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J.* **10**, 477–488.
269. Chen C.J., Elkins C., Sparling P.F. (1998) Phase variation of hemoglobin utilization in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **66**, 987–993.
270. Banerjee A., Wang R., Supernavage S.L., Ghosh S.K., Parker J., Ganesh N.F., Wang P.G., Gulati S., Rice P.A. (2002) Implications of phase variation of a gene (*pgtA*) encoding a pilin galactosyl transferase in gonococcal pathogenesis. *J. Exp. Med.* **196**, 147–162.
271. Yang Q.L., Gotschlich E.C. (1996) Variation of gonococcal lipooligosaccharide structure is due to alterations in poly-G tracts in *lgt* genes encoding glycosyl transferases. *J. Exp. Med.* **183**, 323–327.
272. Jamet A., Jousset A.B., Euphrasie D., Mukorako P., Boucharlat A., Ducouso A., Charbit A., Nassif X. (2015) A new family of secreted toxins in pathogenic *Neisseria* species. *PLoS Pathog.* **11**, e1004592.
273. van der Ende A., Hopman C.T., Zaat S., Essink B.B., Berkhout B., Dankert J. (1995) Variable expression of class I outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing between the -10 and -35 regions of the promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 2475–2480.
274. Sarkari J., Pandit N., Moxon E.R., Achtman M. (1994) Variable expression of the *Opc* outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol. Microbiol.* **13**, 207–217.
275. Carson S.D., Stone B., Beucher M., Fu J., Sparling P.F. (2000) Phase variation of the gonococcal siderophore receptor *FetA*. *Mol. Microbiol.* **36**, 585–593.
276. Snyder L.A.S., Butcher S.A., Saunders N.J. (2001) Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp. *Microbiology.* **147**, 2321–2332.
277. Aho E.L., Dempsey J.A., Hobbs M.M., Klapper D.G., Cannon J.G. (1991) Characterization of the *opa* (class 5) gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1429–1437.
278. Jordan P., Snyder L.A., Saunders N.J. (2003) Diversity in coding tandem repeats in related *Neisseria* spp. *BMC Microbiol.* **3**, 23.
279. Woods J.P., Spinola S.M., Strobel S.M., Cannon J.G. (1989) Conserved lipoprotein H.8 of pathogenic *Neisseria* consists entirely of pentapeptide repeats. *Mol. Microbiol.* **3**, 43–48.
280. Tønjum T., Caugant D.A., Dunham S.A., Koomey M. (1998) Structure and function of repetitive sequence elements associated with a highly polymorphic domain of the *Neisseria meningitidis* PilQ protein. *Mol. Microbiol.* **29**, 111–124.
281. Snyder L.A., Shafer W.M., Saunders N.J. (2003) Divergence and transcriptional analysis of the division cell wall (*dcw*) gene cluster in *Neisseria* spp. *Mol. Microbiol.* **47**, 431–442.
282. Srikhanta Y.N., Dowideit S.J., Edwards J.L., Falsetta M.L., Wu H.J., Harrison O.B., Fox K.L., Seib K.L., Maguire T.L., Wang A.H., Maiden M.C., Grimmond S.M., Apicella M.A., Jennings M.P. (2009) Phasevariations mediate random switching of gene expression in pathogenic *Neisseria*. *PLoS Pathog.* **5**, e1000400.
283. Kwiatek A., Mrozek A., Bacal P., Piekarowicz A., Adamczyk-Popławska M. (2015) Type III methyltransferase M.NgoAX from *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 regulates biofilm formation and interactions with human cells. *Front. Microbiol.* **6**, 1426.
284. Darmon E., Leach D.R. (2014) Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 1–39.
285. Hamrick T.S., Dempsey J.A.F., Cohen M.S., Cannon J.G. (2001) Antigenic variation of gonococcal pilin expression in vivo: analysis of the strain FA1090 pilin repertoire and identification of the *pilS* gene copies recombining with *pilE* during experimental human infection. *Microbiology.* **147**, 839–849.
286. Helm R.A., Seifert H.S. (2009) Pilin antigenic variation occurs independently of the RecBCD pathway in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **191**, 5613–5621.
287. Criss A.K., Kline K.A., Seifert H.S. (2005) The frequency and rate of pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **58**, 510–519.
288. Mushegian A.R., Koonin E.V. (1996) Gene order is not conserved in bacterial evolution. *Trends Genet.* **12**, 289–290.
289. Itoh T., Takemoto K., Mori H., Gojobori T. (1999) Evolutionary instability of operon structures disclosed by sequence comparisons of complete microbial genomes. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 332–346.
290. Wolf Y.I., Rogozin I.B., Kondrashov A.S., Koonin E.V. (2001) Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context. *Genome Res.* **11**, 356–372.
291. Novichkov P.S., Wolf Y.I., Dubchak I., Koonin E.V. (2009) Trends in prokaryotic evolution revealed by comparison of closely related bacterial and archaeal genomes. *J. Bacteriol.* **191**, 65–73.
292. Rocha E.P. (2003) DNA repeats lead to the accelerated loss of gene order in bacteria. *Trends Genet.* **19**, 600–603.
293. Spencer-Smith R., Varkey E.M., Fielder M.D., Snyder L.A. (2012) Sequence features contributing to

- chromosomal rearrangements in *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS One*. **7**, e46023.
294. Spencer-Smith R., Gould S.W., Pulijala M., Snyder L.A.S. (2018) Investigating potential chromosomal rearrangements during laboratory culture of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microorganisms*. **6**, 10.
295. Shaskolskiy B., Kravtsov D., Kandinov I., Dementieva E., Gryadunov D. (2022) Genomic diversity and chromosomal rearrangements in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Internat. J. Mol. Sci.* **23**, 15644.
296. Prentki P., Teter B., Chandler M., Galas D.J. (1986) Functional promoters created by the insertion of transposable element IS1. *J. Mol. Biol.* **191**, 383–393.
297. Elbeyioglu F., Roberts S.B., Spencer-Smith R., Pulijala M., Zelewska M.A., Nebel J.C., Snyder L.A.S. (2017) Inversion of Correia repeat enclosed elements in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology*. **163**, 3–36.
298. Rouquette-Loughlin C.E., Balthazar J.T., Hill S.A., Shafer W.M. (2004) Modulation of the *mtrCDE*-encoded efflux pump gene complex of *Neisseria meningitidis* due to a Correia element insertion sequence. *Mol. Microbiol.* **54**, 731–741.
299. Дмитриев Г.А. (2007) *Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций*. Москва: Медицинская книга.
300. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Фриго Н.В., Полевщикова С.А., Соломка В.С., Лесная И.Н., Ротанов С.В. (2008) *Стандартные операционные процедуры по проведению видовой идентификации возбудителя гонореи*. Москва: ООО “ДЭКС-ПРЕСС”.
301. Домейка М., Савичева А.М., Соколовский Е., Баллард Р., Унемо М. (2012) *Руководство по лабораторной диагностике инфекций урогенитального тракта*. Санкт-Петербург: ООО “Издательство Н-Л”.
302. Olsen B., Lan P.T., Golparian D., Johansson E., Khang T.H., Unemo M. (2013) Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Vietnam, 2011. *BMC Infect. Dis.* **13**, 40.
303. Carannante A., De Carolis E., Vacca P., Vella A., Vocale C., De Francesco M.A., Cusini M., Del Re S., Dal Conte I., Cristaudo A., Ober P., Sanguinetti M., Stefanelli P. (2015) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and clustering of *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiol.* **15**, 142.
304. Buchanan R., Ball D., Dolphin H., Dave J. (2016) Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 815.e5–815.e7.
305. Meyer T., Buder S. (2020) The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: current testing and future demands. *Pathogens*. **9**, 91.
306. Whiley D.M., Limnios A., Moon N.J., Gehrig N., Goire N., Hogan T., Lam A., Jacob K., Lambert S.B., Nissen M.D., Sloots T.P. (2011) False-negative results using *Neisseria gonorrhoeae porA* pseudogene PCR – a clinical gonococcal isolate with an *N. meningitidis porA* sequence, Australia, March 2011. *Euro Surveill.* **16**, 19874.
307. Ison C.A., Golparian D., Saunders P., Chisholm S., Unemo M. (2013) Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal *porA* mutants are spreading internationally. *Sex. Transm. Infect.* **89**, 197–201.
308. Upton A., Bromhead C., Whiley D.M. (2013) *Neisseria gonorrhoeae* false-positive result obtained from a pharyngeal swab by using the Roche cobas 4800 CT/NG assay in New Zealand in 2012. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1609–1610.
309. Frosch M., Meyer T.F. (1992) Transformation-mediated exchange of virulence determinants by co-cultivation of pathogenic *Neisseriae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 345–349.
310. Bachmann L.H., Desmond R.A., Stephens J., Hughes A., Hook E.W. (2002) Duration of persistence of gonococcal DNA detected by ligase chain reaction in men and women following recommended therapy for uncomplicated gonorrhoea. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3596–3601.
311. Shaskolskiy B., Kandinov I., Kravtsov D., Filippova M., Chestkov A., Solomka V., Kubanov A., Deryabin D., Dementieva E., Gryadunov D. (2021) Prediction of ceftriaxone MIC in *Neisseria gonorrhoeae* using DNA microarray technology and regression analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 3151–3158.
312. Phillips L.T., Witney A.A., Furegato M., Laing K.G., Zhou L., Sadiq S.T. (2023) Time required for nanopore whole-genome sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* for identification of phylogenetic relationships. *J. Infect. Dis.* **228**, 1179–1188.
313. Street T.L., Sanderson N.D., Barker L., Kavanagh J., Cole K., The GonFast Investigators Group, Llewelyn M., Eyre D.W. (2024) Target enrichment improves culture-independent detection of *Neisseria gonorrhoeae* direct from sample with nanopore sequencing. *Microb. Genomics*. **10**, mgen001208.
314. Sánchez-Busó L., Yeats C.A., Taylor B., Goater R.J., Underwood A., Abudahab K., Argimón S., Ma K.C., Mortimer T.D., Golparian D., Cole M.J., Grad Y.H., Martin I., Raphael B.H., Shafer W.M., Town K., Wi T., Harris S.R., Unemo M., Aanensen D.M. (2021) A community-driven resource for genomic epidemiology and antimicrobial resistance prediction of *Neisseria gonorrhoeae* at pathogenwatch. *Genome Med.* **13**, 61.
315. Lin E.Y., Adamson P.C., Ha S.-M., Klausner J.D. (2022) Reliability of genetic alterations in predicting ceftriaxone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* globally. *Microbiol. Spectr.* **10**, 2.
316. Demczuk W., Martin I., Sawatzky P., Allen V., Lefebvre B., Hoang L., Naidu P., Minion J., VanCaeseele P., Haldane D., Eyre D.W., Mulvey M.R. (2020) Equations to predict antimicrobial MICs in *Neisseria gonorrhoeae* using molecular antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, 3.
317. Eyre D.W., De Silva D., Cole K., Peters J., Cole M.J., Grad Y.H., Demczuk W., Martin I., Mulvey M.R., Crook D.W., Walker A.S., Peto T.E.A., Paul J.

- (2017) WGS to predict antibiotic MICs for *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 1937–1947.
318. Ha S.M., Lin E.Y., Klausner J.D., Adamson P.C. (2023) Machine learning to predict ceftriaxone resistance using single nucleotide polymorphisms within a global database of *Neisseria gonorrhoeae* genomes. *Microbiol. Spectr.* **11**, 6.
319. Hicks A.L., Wheeler N., Sánchez-Busó L., Rake-man J.L., Harris S.R., Grad Y.H. (2019) Evaluation of parameters affecting performance and reliability of machine learning-based antibiotic susceptibility testing from whole genome sequencing data. *PLoS Comp. Biol.* **15**, e1007349.
320. Yasir M., Karim A.M., Malik S.K., Bajaffer A.A., Azhar E.I. (2022) Prediction of antimicrobial minimal inhibitory concentrations for *Neisseria gonorrhoeae* using machine learning models. *Saudi J. Biol. Sci.* **29**, 3687–3693.
321. Greenberg L. (1975) Field trials of a gonococcal vaccine. *J. Reprod. Med.* **14**, 34–36.
322. McChesney D., Tramont E.C., Boslego J.W., Ciak J., Sadoff J., Brinton C.C. (1982) Genital antibody response to a parenteral gonococcal pilus vaccine. *Infect. Immun.* **36**, 1006–1012.
323. Eloise W., Seib K.L., Fairley C.K., Pollock G.L., Hocking J.S., McCarthy J.S., Williamson D.A. (2024) *Neisseria gonorrhoeae* vaccines: a contemporary overview. *Clin. Microbiol. Rev.* **37**, e0009423.
324. Waltmann A., Chen J.S., Duncan J.A. (2024) Promising developments in gonococcal vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **37**, 63–69.
325. Frasch C.E., van Alphen L., Holst J., Poolman J.T., Rosenqvist E. (2001) Outer membrane protein vesicle vaccines for meningococcal disease. *Meth. Mol. Med.* **66**, 81–107.
326. Petousis-Harris H., Paynter J., Morgan J., Saxton P., McArdle B., Goodyear-Smith F., Black S. (2017) Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study. *Lancet.* **390**, 1603–1610.
327. Oster P., Lennon D., O'Hallahan J., Mulholland K., Reid S., Martin D. (2005) MeNZB: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine.* **23**, 2191–2196.
328. Looker K.J., Booton R., Begum N., Beck E., Shen J., Turner K.M.E., Christensen H. (2023) The potential public health impact of adolescent 4CMenB vaccination on *Neisseria gonorrhoeae* infection in England: a modelling study. *BMC Public Health.* **23**, 1.
329. Padeniya T.N., Hui B.B., Wood J.G., Seib K.L., Regan D.G. (2023) The potential impact of a vaccine on *Neisseria gonorrhoeae* prevalence among heterosexuals living in a high prevalence setting. *Vaccine.* **41**, 5553–5561.
330. Morriss D.M., Lawson J.W., Rogolsky M. (1978) Effect of a staphylococcal on *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 218–223.
331. Morse S.A., Jones B.V., Lysko P.G. (1980) Pyocin inhibition of *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**, 416–423.
332. John C.M., Griffiss J.M., Apicella M.A., Mandrell R.E., Gibson B.W. (1991) The structural basis for pyocin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **266**, 19303–19311.
333. Kaye D., Levison M.E. (1977) *In vitro* inhibition of growth of *Neisseria gonorrhoeae* by genital microorganisms. *Sex. Transm. Dis.* **4**, 1–3.
334. Bolton M., van der Straten A., Cohen C.R. (2008) Probiotics: potential to prevent HIV and sexually transmitted infections in women. *Sex. Transm. Dis.* **35**, 214–225.
335. Custodio R., Johnson E., Liu G., Tang C.M., Exley R.M. (2020) Commensal *Neisseria cinerea* impairs *Neisseria meningitidis* microcolony development and reduces pathogen colonisation of epithelial cells. *PLoS Pathog.* **16**, e1008372.
336. Aho E.L., Ogle J.M., Finck A.M. (2020) The human microbiome as a focus of antibiotic discovery: *Neisseria mucosa* displays activity against *Neisseria gonorrhoeae*. *Front. Microbiol.* **11**, 577762.
337. Abdellati S., Laumen J., Gonzalez N., Manoharan-Basil S.S., Van Dijck C., De Baetselier I., Martiny D., de Block T., Kenyon C. (2022) *Neisseria mucosa* does not inhibit the growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sci.* **4**, 8. <https://doi.org/10.3390/sci4010008>
338. Custodio R., Ford R.M., Ellison C.J., Liu G., Mickle G., Tang C.M., Exley R.M. (2021) Type VI secretion system killing by commensal *Neisseria* is influenced by expression of type four pili. *eLife.* **10**, e63755.
339. Allsopp L.P., Bernal P., Nolan L.M., Filloux A. (2020) Causalities of war: the connection between type VI secretion system and microbiota. *Cell. Microbiol.* **22**, e13153.
340. Cater K., Międzybrodzki R., Morozova V., Letkiewicz S., Łusiak-Szelachowska M., Rękas J., Weber-Dąbrowska B., Górski A. (2021) Potential for phages in the treatment of bacterial sexually transmitted infections. *Antibiotics.* **10**, 1030.
341. Adamczyk-Popławska M., Golec P., Piekarowicz A., Kwiatek A. (2023) The potential for bacteriophages and prophage elements in fighting and preventing the gonorrhoea. *Crit. Rev. Microbiol.* 1–16.
342. González-Villalobos E., Molina-López J., Balcázar J.L. (2022) Phage therapy for urinary tract infections: does it really work? *Int. Microbiol.* **25**, 665–667.
343. Stone R.L., Culbertson C.G., Powell H.M. (1956) Studies of a bacteriophage active against a chromogenic *Neisseria*. *J. Bacteriol.* **71**, 516–520.
344. Phelps L.N. (1967) Isolation and characterization of bacteriophages for *Neisseria*. *J. Gen. Virol.* **1**, 529–536.
345. Laumen J., Abdellati S., Manoharan-Basil S.S., Van Dijck C., Van den Bossche D., De Baetselier I., De Block T., Malhotra-Kumar S., Soentjens P., Pirnay J., Kenyon C., Merabishvili M. (2022) Screening of anorectal and oropharyngeal samples fails to detect bacteriophages infecting *Neisseria gonorrhoeae*. *Antibiotics.* **11**, 268.

Unveiling *Neisseria gonorrhoeae* Survival: Genetic Variability, Pathogenesis, and Antimicrobial Resistance

B. L. Shaskolskiy^{1,*}, I. D. Kandinov¹, D. A. Gryadunov¹, D. V. Kravtsov¹

¹Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: bls@shaskolskiy.ru

Despite nearly a century of therapy for gonococcal infection with a variety of antimicrobials, more than 80 million cases of this disease are reported annually worldwide. The gonorrhea pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, exhibits an exceptional ability to develop resistance to antibiotics due to its high genetic flexibility. As an obligate pathogen, the gonococcus has evolved mechanisms to evade host defenses, engaging with the innate and adaptive immune responses in both men and women. The bacterium can establish residence within epithelial cells, macrophages, and neutrophils. Through genetic variability and horizontal gene transfer, strains resistant to each of the drugs used in gonorrhea therapy have emerged. The type IV secretion system plays a critical role in horizontal gene transfer, driving the development of antimicrobial resistance. This review explores the pathogenesis and immune evasion mechanisms, antibiotic resistance formation, genetic variability, laboratory analysis methods for the pathogen, and emerging trends in the diagnosis and treatment of gonococcal infections.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, horizontal gene transfer, T4SS, antimicrobial resistance, bacterial pathogenesis

ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ADP-ГЕПТОЗЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. Т. А. Серегина^{а, *}, И. Ю. Петрушанко^а, К. В. Лобанов^а,
Р. С. Шакулов^а, А. С. Миронов^а

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tatyana.s82@gmail.com

Поступила в редакцию 20.05.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принята к публикации 31.05.2024 г.

Решение проблемы множественной лекарственной устойчивости требует нестандартных подходов, поскольку потенциал создания новых антибиотиков практически исчерпан. Управление метаболизмом патогена с целью повышения его восприимчивости к антибактериальной терапии рассматривается как наиболее перспективное направление создания новых комбинированных лекарственных средств. В последние годы возросло количество исследований, посвященных роли биосинтеза компонента клеточной стенки ADP-гептозы в чувствительности бактерий к антибиотикам, а также в патогенезе бактериальной инфекции. В настоящем обзоре рассмотрены основные направления исследований в области применения ADP-гептозы и ее аналогов в терапии бактериальных инфекций. Известна исключительная роль ADP-гептозы в индукции иммунного ответа через активацию сигнального пути NF-κB и синтезе провоспалительных цитокинов. В наших последних работах показано, что нарушение синтеза ADP-гептозы и оттока седогеупгулозо-7-фосфата из пентозофосфатного пути индуцирует редокс-дисбаланс и полностью дезорганизует метаболизм низкомолекулярных тиолов, таких как сероводород, цистеин, глутатион, что делает бактериальную клетку чрезвычайно уязвимой к действию антибиотиков. Нами показано, что сверхчувствительность мутантов с нарушенным синтезом ADP-гептозы к широкому спектру антибиотиков объясняется скорее новым метаболическим статусом, чем изменением проницаемости клеточной стенки. Таким образом, потенциальные ингибиторы биосинтеза ADP-гептозы могут сочетать в себе такие положительные качества, как иммуномодулирующий эффект и мощное потенцирующее действие при проведении антибиотикотерапии.

Ключевые слова: грамотрицательные бактерии, антибиотики, синтез ADP-гептозы, окислительный стресс, редокс-статус клетки, ингибиторы ферментов биосинтеза ADP-гептозы, антимикробные адъюванты

DOI: 10.31857/S0026898424060048, **EDN:** HMZWNA

ВВЕДЕНИЕ

Появление все новых и новых противомикробных препаратов с последующим их широкомасштабным и бесконтрольным использованием как в клинической практике, так и в быту, привело к возникновению большого количества резистентных штаммов патогенных микроорганизмов, осложняющих хирургическое вмешательство и лечение таких социально значимых заболеваний, как туберкулез, венерические болезни, иммунодефицитные состояния [1]. Синтез антибиотиков новых поколений, обладающих альтернативной химической структурой, не позволяет решить проблемы, связанные с множественной лекарственной устойчивостью, поскольку их при-

менение неизбежно ведет к эволюции защитных механизмов бактериальной клетки: модификации ферментов-мишеней, изменению структуры клеточной стенки и систем транспорта антибиотика, активации процессов деградации молекул антибиотика [2]. В настоящее время практически полностью исчерпан спектр возможных механизмов действия веществ, обладающих потенциальной антибиотической активностью. Проблема антибиотикорезистентности требует принципиально нового подхода к ее решению. В последние годы появилось много публикаций, посвященных взаимосвязи метаболического статуса бактериальной клетки и ее чувствительности к антибактериальным препаратам [3–7]. Были открыты

новые неспецифические системы защиты бактерий от действия антибиотиков с участием низкомолекулярных тиолов, таких как сероводород [7–10]. Наиболее перспективным подходом к модулированию чувствительности микроорганизмов к антибиотику вне зависимости от механизма его действия, с нашей точки зрения, выглядит поиск наиболее уязвимых точек в центральном метаболизме бактериальной клетки, воздействуя на которые можно значительно повысить эффективность антибактериальной терапии. Создание нового поколения метаболических адьювантов, не обладающих собственным антибиотическим действием, но значительно усиливающих действие уже существующих препаратов, позволит продлить клиническое использование известных антибиотиков.

Пентозофосфатный путь (ПФП) – один из ключевых метаболических процессов, служащий источником пентозофосфатов для синтеза всех нуклеотидов и нуклеиновых кислот, в том числе и пиридинового нуклеотида NADPH, необходимого для роста клеток и их защиты от окислительного стресса. В каскаде превращений неокислительной ветви ПФП в клетках разных микроорганизмов синтезируется уникальный семиуглеродный сахар – седогептулозо-7-фосфат (С7Ф) – предшественник широкого спектра вторичных метаболитов, включая компоненты клеточной стенки и антибиотики, в частности аминогликозидные [11]. В клетках грамотрицательных бактерий С7Ф является предшественником активированной ADP-глицероманногептозы (ADP-гептозы), важного компонента липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки, соединяющего внутренний кор (2-кето-3-дезоксиктанат, КДО) с поверхностным О-антигеном (рис. 1) [12, 13].

Нарушение синтеза ADP-гептозы приводит к формированию шероховатых колоний (так называемый фенотип “deer rough”). Клетки с этим фенотипом характеризуются повышенной чувствительностью к различным гидрофобным соединениям, в том числе к антибиотикам новобиоцину, актиномицину D, эритромицину и др. [12, 16]. Ранее ферменты биосинтеза ADP-гептозы рассматривали как потенциальные мишени для противомикробных препаратов [17–20], но отсутствие структурных данных для ферментов-гомологов из разных видов патогенов существенно затрудняет исследования и подбор оптимальных химических структур ингибиторов. Инактивация генов ферментов биосинтеза ADP-гептозы не оказывает существенного влияния на скорость роста бактериальной культуры, однако заметно повышает чувствительность к широкому спектру антибиотиков [14], поэтому адьюванты на основе ингибиторов ферментов синтеза ADP-гептозы могут использоваться в качестве новых препаратов, усиливающих действие традиционных антибиотиков.

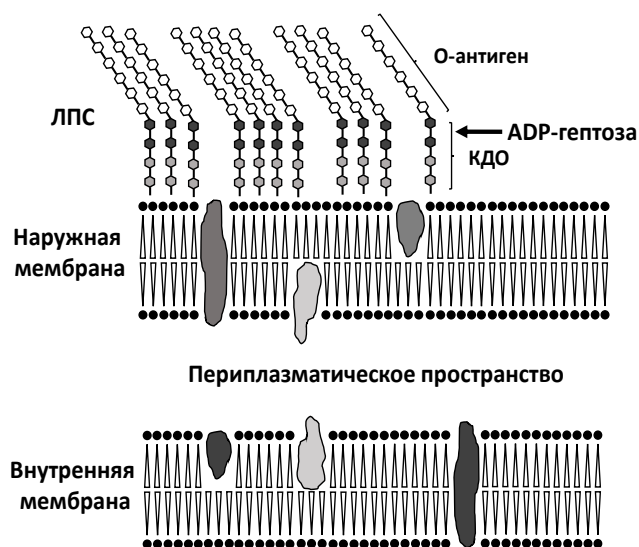


Рис. 1. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий [14, лицензия Creative Commons Attribution (CC BY)]. ADP-гептоза является связующим звеном между полисахаридными цепями О-антигена и внутренним ядром (КДО) [13]. Структура ЛПС-мутантов, утративших ADP-гептозу, нестабильна из-за отсутствия отрицательно заряженных фосфатных групп на гептозных остатках, которые в норме стабилизируют структуру за счет взаимодействия с положительно заряженными ионами. Кроме того, клеточная стенка мутантов, утративших ADP-гептозу, характеризуется повышенной проницаемостью для гидрофобных соединений [15].

БИОСИНТЕЗ ADP-ГЕПТОЗЫ: ФЕРМЕНТЫ И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ

Предшественником активированной ADP-гептозы является семиуглеродный сахар С7Ф, синтезируемый в неокислительной ветви ПФП (рис. 2). Следует отметить, что образование С7Ф тесно связано с синтезом пентозофосфатов и их возвратом в гликолиз через неокислительную ветвь ПФП. Таким образом, нарушение оттока С7Ф может оказывать существенное влияние на метаболическое равновесие в ПФП.

У *Escherichia coli* гены, участвующие в синтезе и транслокации компонентов ЛПС, распределены по трем оперонам в локусе *rfa* (известном также, как *waa*), однако гены *gmhA*, *hldE* и *gmhB*, кодирующие ферменты (рис. 2), отвечающие за начальные этапы синтеза ADP-гептозы, в него не входят [21]. Седогептулозо-7-фосфатизомераза (*GmhA*) осуществляет первый этап превращения С7Ф в D-глицеро-D-манногептозо-7-фосфат. Экспрессия гена *gmhA* находится под положительным контролем ДНК-связывающего транскрипционного регулятора *OmpR* [22]. Регулон *ompR* представляет собой совокупность генов,

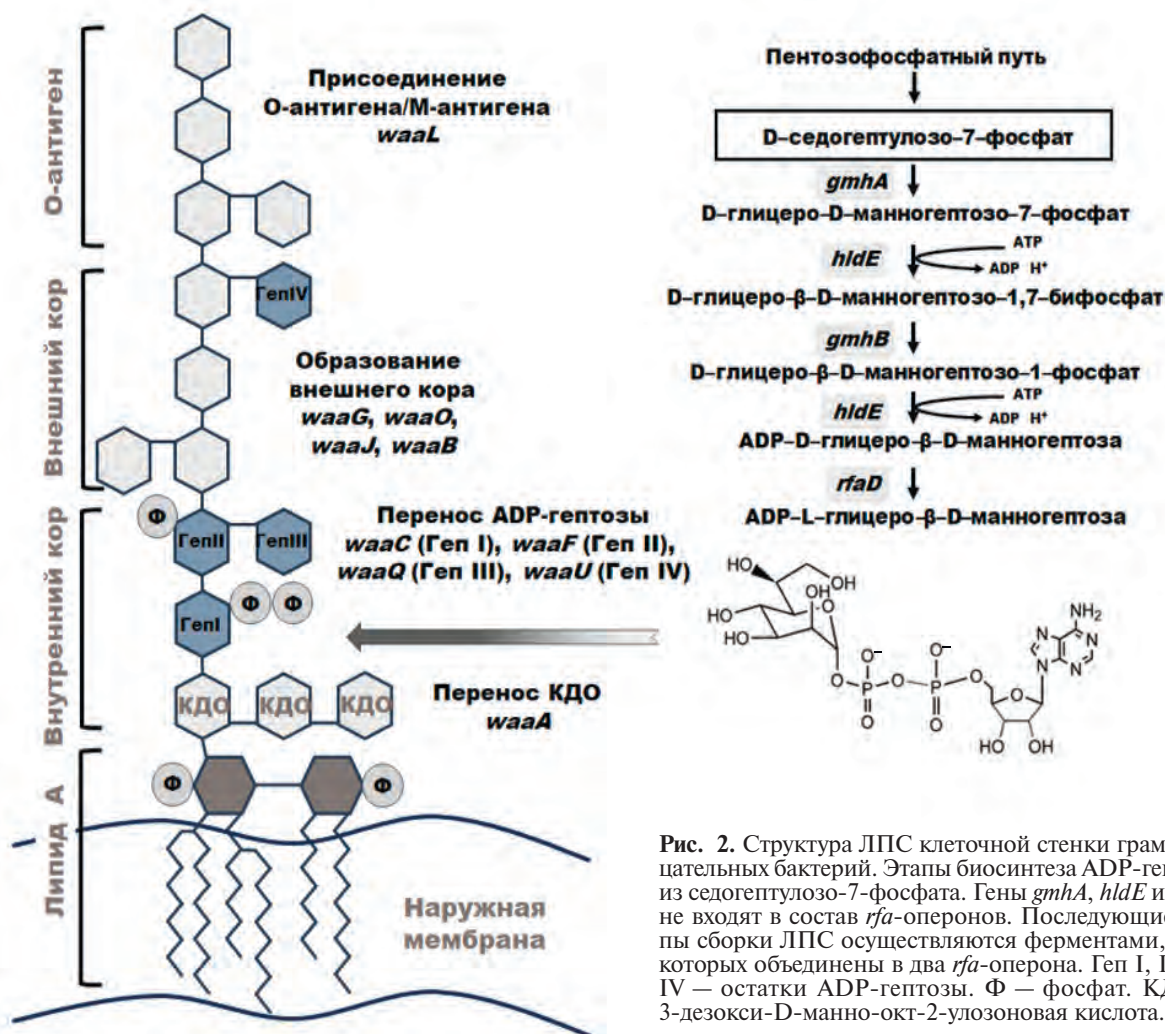


Рис. 2. Структура ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Этапы биосинтеза АДР-гептозы из седогептулозо-7-фосфата. Гены *gmhA*, *hldE* и *gmhB* не входят в состав *rfa*-оперонов. Последующие этапы сборки ЛПС осуществляются ферментами, гены которых объединены в два *rfa*-оперона. Ген I, II, III, IV — остатки АДР-гептозы. Ф — фосфат. КДО — 3-дезоксид-D-манно-окт-2-улозоновая кислота.

участвующих в ответе на так называемый “стресс оболочки” (envelope stress response) и кодирующих неспецифические транспортеры, такие как порины OmpF, OmpC, OmpA, OmpX, а также системы белков-переносчиков AcrAB-TolC, играющих роль в возникновении множественной лекарственной устойчивости [23]. Антагонистом OmpR является регулятор SrxR, который, в свою очередь, тормозит экспрессию генов, снижая тем самым уровень соответствующих белков-транспортеров в мембране клетки и ограничивая синтез ЛПС [24]. HldE представляет собой бифункциональный фермент, N-концевой домен которого является рибкиназой, присоединяющей фосфат в первом положении к D-глицеро-D-манногептозо-7-фосфату с образованием D-глицеро-D-манногептозо-1,7-бифосфата. Фосфат в седьмом положении отщепляет фосфатаза Gmh B. С-концевой домен HldE функционирует как нуклеотидсахартрансфераза и присоединяет АДР к D-глицеро-D-манногептозо-1-фосфату с образованием АДР-D-глицеро-β-D-манно-

гептозы. Регуляция экспрессии генов *hldE* и *gmhB* остается малоизученной.

Заключительный этап активации АДР-гептозы с последующим ее переносом на внутренний кор ЛПС осуществляется ферментами, гены которых объединены в первый *rfa*-оперон, состоящий из *rfaD* (или *gmhD*), *waaF* (или *rfaF*), *waaC* (или *rfaC*) и *waaL* (или *rfaL*). RfaD АДР-L-глицеро-D-манногептозо-6-эпимераза осуществляет превращение АДР-D-глицеро-β-D-манногептозы в АДР-L-глицеро-β-D-манногептозу. Гептозилтрансферазы I и II (WaaC и WaaF) переносят первый и второй остатки гептозы на КДО внутреннего кора ЛПС. Ген *waaL* кодирует лигазу, необходимую для прикрепления О-антигена или альтернативного М-антигена к внешнему кору ЛПС (рис. 2) [21]. Гены первого *rfa*-оперона находятся под положительным контролем двухкомпонентной системы ZraSR, включающей ZraS — мембраносвязанную сенсорную киназу, и ZraR — регулятор цитоплазматического ответа [25]. Роль системы Zra остается неопределен-

ной: она участвует в ответе на стресс, вызванный действием двухвалентных металлов (в частности, Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) [26], а также на стресс оболочки.

Второй оперон содержит гены *waaQ* (*rfaQ*) и *waaU* (*rfaK*), которые кодируют гептозилтрансферазы, добавляющие третий и четвертый остатки гептозы, соответственно (рис. 2), гены *waaG* (или *rfaG*), *waaO* (или *rfaI*) и *waaJ* (или *rfaJ*) кодируют глюкозилтрансферазы, участвующие в формировании наружного кора ЛПС из трех остатков глюкозы, *waaB* (*rfaB*) кодирует галактозилтрансферазу и добавляет остаток галактозы к первому остатку глюкозы наружного кора. Гены *waaY* (*rfaY*) и *waaP* (*rfaP*) кодируют киназы, ответственные за фосфорилирование гептоз, *waaZ* (*rfaZ*) участвует в прикреплении третьего остатка КДО во время биосинтеза ядра ЛПС и, наконец, ген *waaS* (*rfaS*), кодирует фермент, необходимый для прикрепления рамнозы к ядру ЛПС путем связывания с остатком КДО II [21]. Следует отметить, что наружный кор ЛПС не формируется при инактивации синтеза или транслокации гептозы, в результате возникает фенотип “deep rough”.

Короткий третий оперон *waa* содержит ген *waaA*, который кодирует трансферазу, добавляющую два остатка КДО к липиду А, и ген *coaD*, не участвующий в синтезе ЛПС [15, 27]. Определяющей особенностью ЛПС *E. coli* являются фосфорильные заместители в гептозных остатках ЛПС, необходимые для стабильности и структурной организации мембраны. Благодаря своим отрицательным зарядам, эти заместители обеспечивают соединение соседних молекул ЛПС, опосредованное двухвалентными катионами [28, 29].

РОЛЬ ADP-ГЕПТОЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Поверхность внешней мембраны грамотрицательных бактерий покрыта ЛПС, которые состоят из трех компонентов – липида А, олигосахаридов кора, обычно содержащих глюкозу, гептозу, галактозу, 2-кето-3-дезоксиктонат (КДО) и высоковариабельный компонент О-антигена [30]. ЛПС действует как барьер, защищающий от крупных молекул и гидрофобных соединений окружающей среды. Молекулы ЛПС интегрированы в фосфолипидный слой наружной мембраны, они поддерживают правильную структурную организацию таких белков, как порины, осуществляющие неспецифический транспорт малых молекул и выступающие в качестве рецепторов бактериофагов [31].

ЛПС грамотрицательных бактерий непроницаем для различных токсинов, протеаз, лизоцима, детергентов и гидрофобных антибактериальных соединений. Компоненты ЛПС,

высвобождающиеся в больших количествах при лизисе бактериальных клеток, по сути, являются эндотоксинами, вызывающими тяжелые осложнения бактериальных инфекций, в том числе сепсис. Недавно в опытах на *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* серовар *typhimurium*, птичьей патогенной *E. coli* (АРЕС) и *Campylobacter jejuni* установили, что длина ЛПС играет ключевую роль в способности возбудителей колонизировать кишечник, проникать в клетки хозяина, образовывать биопленки и в их подвижности [32–34]. Таким образом, ЛПС представляет собой фактор вирулентности, ответственный за патогенез бактериальной инфекции [35, 36]. Относительно недавно стали появляться данные о том, что ключевой промежуточный метаболит биосинтеза ЛПС, D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфат, может активировать сигнальный путь транскрипционного регулятора NF-κB и индуцировать экспрессию генов провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, запуская врожденный иммунный ответ [37, 38]. Обнаружено, что D-глицеро-β-D-манногептозо-1-фосфат (β-НМР) также может индуцировать TIFA-зависимую передачу сигналов NF-κB и воспалительный ответ, как и D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфат [39]. Однако оставалось неясным, является ли D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфат истинным патогенассоциированным молекулярным паттерном (pathogen-associated molecular pattern, PAMP). Группа исследователей под руководством Шао показала, что ключевой промежуточный продукт биосинтеза ЛПС, ADP-гептоза, может транспортироваться в клетки млекопитающих и связываться с ALPK1 (альфа-киназой 1), что приводит к серии сильных иммунных реакций [40]. Предположили, что связывание ADP-гептозы с ALPK1 может вызвать конформационные изменения, которые приводят к фосфорилированию ее киназного домена и дальнейшей активации TIFA, что, в конечном итоге, активирует нижележащий путь NF-κB. Важно отметить, что в этой же работе показано, что D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфат не может действовать непосредственно как PAMP. Вместо этого аденилаттрансфераза хозяйской клетки превращает его в ADP-гептозо-7-фосфат, который активирует ALPK1 в меньшей степени, чем ADP-гептоза. Более того, инъекции ADP-гептозы вызывали у мышей сильные воспалительные реакции, в то время как инъекции D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфата не оказывали заметного эффекта на продукцию медиаторов воспаления. Участие во взаимодействии ADP-гептозы, а не других интермедиатов гептозного пути подтверждено *in vitro* путем скрининга библиотеки мутантов транспозона *Y. pseudotuberculosis* [40]. Установлено, что инактивация *gmhA* и *hldE* пре-

пятствует активации пути NF- κ B, в то время как делеции *gmhB* и *rfaD* не влияли на активацию этого ядерного фактора [40]. Эти данные расширяют наши представления о бактериальных метаболитах как новом типе PAMP, обладающих большим потенциалом использования в разработке новых иммуномодуляторов и антивирулентных адьювантов.

РОЛЬ БИОСИНТЕЗА ADP-ГЕПТОЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА КЛЕТКИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

Согласно опубликованным данным, нарушение синтеза ADP-гептозы влечет за собой реорганизацию компонентов внешней мембраны клеточной стенки, приводя к изменению барьерной функции в сторону повышения проницаемости для гидрофобных соединений [41]. Однако метаболическим предшественником ADP-гептозы является С7Ф, образующийся в ПФП наряду с пентозофосфатами и генерацией восстановительных эквивалентов NADPH [42]. Таким образом, направление С7Ф из ПФП на синтез ЛПС может влиять на поддержание восстановительного потенциала NADPH и стрессоустойчивости бактериальной клетки в целом.

В наших работах мы сосредоточились на изучении фенотипа и метаболического статуса штаммов с инактивированными генами биосинтеза ADP-гептозы (*gmhA*, *hldE*, *gmhB*, *rfaD*), а также дефектным по генам транслоказ (*waaC* и *waaF*), отвечающих за формирование гептозного мостика, связывающего внутренний и внешний кор ЛПС (рис. 2). Штаммы *ΔgmhA*, *ΔhldE*, *ΔrfaD* и *ΔwaaC* демонстрировали высокую чувствительность к широкому спектру антибиотиков и резкое изменение параметров центрального метаболизма (снижение пула NADPH, АТФ, низкомолекулярных тиолов). Интересно, что мутант *ΔwaaF* оказался значительно менее чувствительным к тестируемым антибиотикам, из чего следует, что добавление второго остатка гептозы к КДО, по-видимому, не имеет столь драматических последствий. Штамм с мутацией *ΔgmhB* практически не отличается от штамма дикого типа. Это связано с тем, что делеция гена *gmhB* не приводит к полному нарушению синтеза ADP-гептозы, поскольку клетки *E. coli* содержат гомологичные ферменты. Продукт гена *gmhB* (D-глицеро- β -D-манногептозо-1,7-бисфосфат-7-фосфатаза) представляет собой фермент, принадлежащий к подклассу фосфатаз. В клетках *E. coli* присутствует несколько подобных ферментов, например, имидазолглицеринфосфатдегидратаза/гистидинолфосфатаза HisB, участвующая в биосинтезе гистидина. Согласно опубликованным данным, активность

этих ферментов может компенсировать дефект делеции *gmhB* [20]. Кроме того, изменения редокс-статуса и других измеряемых параметров у этих мутантов (*ΔwaaF*, *ΔgmhB*) были не столь значительными, как у штаммов с высокой чувствительностью к антибиотикам (*ΔgmhA*, *ΔhldE*, *ΔrfaD* и *ΔwaaC*).

Ранее мы показали, что инактивация генов *gmhA*, *hldE*, *rfaD* и *waaC* наряду с утратой ADP-гептозы провоцирует развитие мощного окислительного стресса, сопровождающегося нарушением гомеостаза низкомолекулярных тиолов, сероводорода, цистеина и глутатиона, которые играют важную роль в стрессоустойчивости клеток [7, 9, 43]. Ограничение метаболизма цистеина (*ΔcysB* и *ΔcysE*) и ингибирование синтеза глутатиона (*ΔgshAB*) влияют на редокс-статус исследуемых мутантов и приводят не к ожидаемому повышению, а к снижению чувствительности мутанта *ΔgmhA* к антибиотикам. В то же время блокирование экспорта цистеина (*ΔeamA*) или увеличение импорта (*P_{let}-tcyP*) цистина, являющего окисленной формой цистеина, приводит к еще большей чувствительности клеток с делецией *gmhA* к антибиотикам [43]. Выявлена корреляция между ростом чувствительности к антибиотикам и повышением доли окисленного глутатиона (GSSG) [44]. Снижение пула восстановительных эквивалентов NADPH в мутантах, утративших ADP-гептозу, ведет к возрастанию уровня окисленного глутатиона и редокс-модификации белков, следствием чего может стать изменение метаболического статуса клетки [44]. Таким образом, установлено, что весь метаболизм низкомолекулярных тиолов в “*deep rough*” мутантах направлен на обеспечение глутатионилирования белков [45], которое не только защищает белки от необратимого окисления, но и может существенно изменять их функционирование [46]. В ходе проведенных исследований обнаружено, что чувствительность мутантов *ΔgmhA*, утративших ADP-гептозу, может быть супрессирована активацией биосинтеза пуринов (рис. 3). Оказалось, что конститутивная экспрессия генов *purR*-регулона, включая серин-глициновый путь (рис. 3), приводит к супрессии чувствительности к антибиотикам и окислителям, а также к нормализации пула восстановительных эквивалентов NADPH, активности системы SoxRS защиты от окислительного стресса и к снижению уровня окислительной модификации белков [44].

Нам удалось показать, что высокую чувствительность “*deep-rough*” мутантов нельзя объяснить исключительно нарушением барьерной функции ЛПС. Наибольшую чувствительность к антибиотикам и изменения в центральном

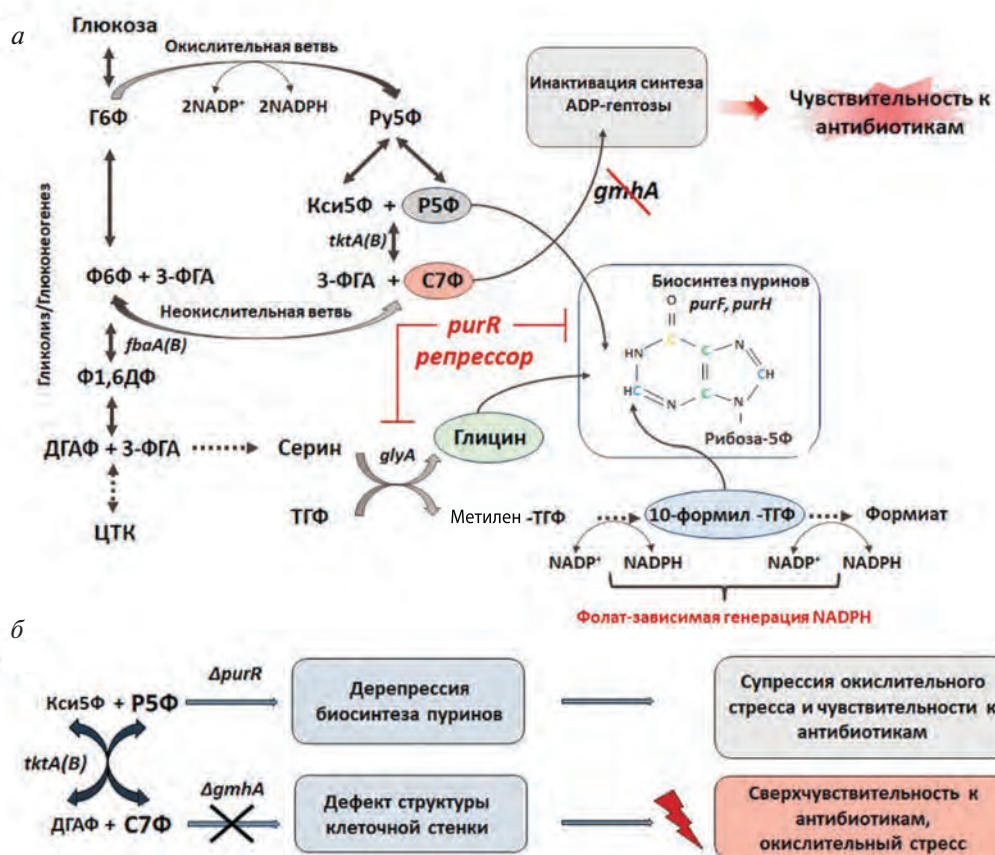


Рис. 3. Биосинтез пуринов как фактор, модулирующий чувствительность мутантов по ADP-гептозе. *а* – Метаболическая схема пентозофосфатного пути, показывающая взаимосвязь процессов синтеза предшественника ADP-гептозы – седогептулозо-7-фосфата, рибозо-5-фосфата и восстановления NADPH. Репрессор PurR регулирует синтез пуринов, начиная с образования фосфорибозилпирофосфата, а также серин-глициновый путь (ген *glyA*), который наряду с окислительной ветвью пентозофосфатного пути является источником генерации NADPH. *б* – Инактивация синтеза ADP-гептозы приводит к фенотипу “deer tough”, гиперчувствительности к антибиотикам и окислительному стрессу. Активация биосинтеза пуринов в бактериальных клетках с нарушенным синтезом ADP-гептозы подавляет чувствительность к антибиотикам и окислительный стресс [44], лицензия Creative Commons Attribution (CC BY). Г6Ф – глюкозо-6-фосфат, Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат, 3-ФГА – глициральдегид-3-фосфат, Ф1,6ДФ – фруктозо-1,6-ди-фосфат, ДГАФ – дигидроксиацетонфосфат, Рy5Ф – рибулозо-5-фосфат, P5Ф – рибозо-5-фосфат, Кси5Ф – ксило-зо-5-фосфат, C7Ф – седогептулозо-7-фосфат, ТГФ – тетрагидрофолат, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

метаболизме демонстрировали мутанты по генам биосинтеза (*gmhA*, *hldE*, *rfaD*) и мутант по транслоказе первого остатка гептозы (*waaC*). Нарушение синтеза ADP-гептозы, по-видимому, провоцирует усиление центрального метаболизма, включая цикл трикарбоновых кислот. На фоне делеции *gmhA* существенно возрастает уровень редокс-чувствительной глюконогенной альдолазы FbaV [44]. Изменение активности ферментов путем глутатионирования играет важную роль в регуляции биосинтетических процессов [47]. Увеличение активности альдолазы FbaV у мутантов *gmhA* на фоне повышенного уровня глутатионирования белков свидетельствует о значительном перераспределении центральных метаболических потоков.

СОЗДАНИЕ ИНГИБИТОРОВ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ СИНТЕЗА ADP-ГЕПТОЗЫ

Ферменты биосинтеза ADP-гептозы давно вызывают интерес в качестве мишеней для создания адьювантов, повышающих эффективность антибактериальной терапии [17, 19, 20, 48]. Следует отметить, что у клинически значимых грамотрицательных микроорганизмов ферменты биосинтеза ADP-гептозы обладают высокой степенью гомологии [18, 20]. Однако создать клинически значимые, эффективные, биодоступные ингибиторы до сих пор не удалось, что, по-видимому, связано с недостатком данных о структуре этих ферментов у различных патогенов. Сами ингибиторы биосинтеза ADP-гептозы не долж-

ны обладать противомикробной активностью, поскольку инактивация генов этого биосинтетического пути не влияет существенно на скорость роста бактериальной культуры [14] и позволяет избежать появления новых резистентных форм в процессе их клинического и бытового использования.

Известны попытки создания ингибиторов первых двух ферментов биосинтеза ADP-гептозы (GmhA и HldE) на основе аналогов D-глицеро-D-манногептозо-7-фосфата. Обнаружено, что GmhA и HldE чрезвычайно чувствительны к структурным модификациям в положениях 6 и 7 гептозного каркаса. Эпимерный аналог гептозо-7-фосфата, имеющий конфигурацию D-глюкопиранозы, оказался лучшим ингибитором обоих ферментов, но также и единственной молекулой этого ряда, которая могла ингибировать GmhA ($IC_{50} = 34$ мкМ) и HldE ($IC_{50} = 9.4$ мкМ) в микромолярном диапазоне концентраций [19]. Еще одной попыткой стала работа, посвященная изучению ингибирующей активности ряда фосфорил- и фосфонилзамещенных производных, содержащих гидроксаматный фрагмент, рибозы или гекозозы, направленных на связывание иона Zn^{2+} в активном сайте фермента GmhA. Некоторые из этих соединений оказались наномолярными ингибиторами GmhA. Они лишены цитотоксичности в отношении клеток гепатокарциномы HepG2 и собственной антибактериальной активности, но при этом предотвращают гептозилирование ЛПС *in vitro* у Enterobacteriaceae, а также усиливают действие эритромицина и рифампицина на клетки *E. coli* дикого типа [48]. Результатом высокопроизводительного скрининга (HTS) 40000 соединений из внутренней библиотеки Mutabilis с использованием люминесцентного анализа HldE-киназного активности *E. coli* стало открытие ингибиторов 1 и 2 с IC_{50} в диапазоне 50–70 мкМ. Показано, что эти соединения являются конкурентоспособными и обратимыми ингибиторами по отношению к АТР в реакции, катализируемой киназой HldE. Исследование взаимосвязи структуры и активности соединений этого ряда привело к значительному улучшению эффективности соединения 5x, имеющего $IC_{50} = 0.11$ мкМ [18]. Соединения этого ряда были также способны ингибировать HldA *Neisseria meningitidis*, гомолог киназного домена HldE *E. coli*, но полностью неактивны в отношении рибокиназы *E. coli*. Учитывая сходство между HldE *E. coli* и HldA *N. meningitidis*, соединения этой серии, скорее всего, селективны в отношении HldE/HldA грамтрицательных бактерий [18]. В качестве возможных мишеней для создания ингибиторов рассматривали также гептозилтрансферазы I и II (WaaC и WaaF) [48]. Особенно интересным представляется обнаружение ингибирующего эффекта аминокликозидных антибиотиков на эти ферменты. Экспериментально подтверждено, что несколько аминокликозидов это первые в своем классе наномолярные ингибиторы гептозилтрансфераз, причем у лучшего ингибитора величина $K_i = 600 \pm 90$ нМ [49]. Таким

образом, ингибирование рибосомы не является единственным и основным механизмом действия аминокликозидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные данные свидетельствуют о том, что ADP-гептоза представляет собой уникальный фактор вирулентности грамтрицательных патогенов, обладающий иммуномодулирующими свойствами. Терапия инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных в группу ESKAPE (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*), зачастую требует применения высокотоксичного антибиотика — колистина, мишенью которого является липид А [50]. Комбинированная терапия ацинетобактерной (*A. baumannii*) инфекции колистином в сочетании с дорипиномом снижала уровень трех метаболитов ПФП, а именно С7Ф, D-рибозо-5-фосфата и D-эритрозно-4-фосфата [51]. Результаты упомянутых исследований показывают, что эти антибиотики мешают биосинтезу ADP-гептозы у *A. baumannii* путем ингибирования ПФП. Нами показано, что инактивация синтеза ADP-гептозы в клетках *E. coli* влечет за собой кардинальную перестройку центрального метаболизма, в том числе ПФП, приводя к снижению восстановительных эквивалентов NADPH и уровня АТР, необходимых для осуществления анаболических процессов при росте и делении. Кроме того, клетки, утратившие ADP-гептозу, не способны генерировать сероводород, важный антибиотикопротективный фактор [14]. Блокирование пути биосинтеза ADP-гептозы провоцирует развитие мощного окислительного стресса, сопровождающегося полной дезорганизацией метаболизма тиолов, выражающейся в тотальном глутатионилировании белков и изменении активности редокс-зависимых ферментов центрального метаболизма [43]. Таким образом, ферменты биосинтеза ADP-гептозы представляют собой перспективные мишени для создания антивирулентных адьювантов, обладающих как иммуномодулирующими, так и потенцирующими действие антибиотиков свойствами. Следует отметить, что несмотря на высокую гомологию ферментов данного метаболического пути у грамтрицательных бактерий, еще недостаточно структурных данных для создания высокоселективных и нетоксичных ингибиторов, что представляется важным направлением дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность Е.А. Нудлеру, В.А. Митькевичу и А.А. Макарову за ценные замечания при написании и обсуждении настоящего обзора.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF—193021X0001).

Настоящая работа выполнена без использования людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bharadwaj A., Rastogi A., Pandey S., Gupta S., Sohal J.S. (2022) Multidrug-resistant bacteria: their mechanism of action and prophylaxis. *BioMed. Res. Int.* **2022**, 5419874. <https://doi.org/10.1155/2022/5419874>
- Darby E.M., Trampari E., Siasat P., Gaya M.S., Alav I., Webber M.A., Blair J.M.A. (2023) Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat. Rev. Microbiol.* **21**, 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* **130**, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- Lobritz M.A., Belenky P., Porter C.B.M., Gutierrez A., Yang J.H., Schwarz E.G., Dwyer D.J., Khalil A.S., Collins J.J. (2015) Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 8173–8180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509743112>
- Dwyer D.J., Belenky P.A., Yang J.H., MacDonald I.C., Martell J.D., Takahashi N., Chan C.T., Lobritz M.A., Braff D., Schwarz E.G., Ye J.D., Pati M., Vercruyse M., Ralifo P.S., Allison K.R., Khalil A.S., Ting A.Y., Walker G.C., Collins J.J. (2014) Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, E2100–E2109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401876111>
- Stokes J.M., Lopatkin A.J., Lobritz M.A., Collins J.J. (2019) Bacterial metabolism and antibiotic efficacy. *Cell Metabolism.* **30**, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.009>
- Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science.* **334**, 986–990. <https://doi.org/10.1126/science.1209855>
- Mironov A., Seregina T., Nagornyykh M., Luhachack L., Korolkova L., Errais Lopes L., Kotova V., Zavlilgelsky G., Shakulov R., Shatalin R., Nudler E. (2017) A mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 6022–6027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703576114>
- Mironov A., Seregina T., Shatalin K., Nagornyykh M., Shakulov R., Nudler E. (2020) CydDC functions as a cytoplasmic cystine reductase to sensitize *Escherichia coli* to oxidative stress and aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 23565–53570. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007817117>
- Seregina T., Lobanov K., Шакулов Р., Миронов А. (2022) Повышение бактерицидного эффекта антибиотиков путем ингибирования ферментов, вовлеченных в генерацию сероводорода у бактерий. *Молекуляр. биология.* **57**, 697–709.
- Sprenger G.A. (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **164**, 324–330. <https://doi.org/10.1007/BF02529978>
- Kneidinger B., Marolda C., Graninger M., Zamyatina A., McArthur F., Kosma P., Valvano M.A., Messner P. (2002) Biosynthesis pathway of ADP-l-glycero-β-D-manno-heptose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 363–369. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.363-369.2002>
- Huang K.C., Mukhopadhyay R., Wen B., Gitai Z., Wingreen N.S. (2008) Cell shape and cell-wall organization in gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 19282–19287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805309105>
- Seregina T.A., Petrushanko I.Yu., Shakulov R.S., Zaripov P.I., Makarov A.A., Mitkevich V.A., Mironov A.S. (2022) The inactivation of LPS biosynthesis genes in *E. coli* cells leads to oxidative stress. *Cells.* **11**. <https://doi.org/10.3390/cells11172667>
- Schnaitman C.A., Klena J.D. (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 655–682. <https://doi.org/10.1128/mr.57.3.655-682.1993>
- Taylor P.L., Blakely K.M., de Leon G.P., Walker J.R., McArthur F., Evdokimova E., Zhang K., Valvano M.A., Wright G.D., Junop M.S. (2008) Structure and function of sedoheptulose-7-phosphate isomerase, a critical enzyme for lipopolysaccharide biosynthesis and a target for antibiotic adjuvants. *J. Biol. Chem.* **283**, 2835–2845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706163200>
- Desroy N., Denis A., Oliveira C., Atamanyuk D., Briet S., Faivre F., LeFrallie G., Bonvin Y., Oxoby M., Escaich S., Floquet S., Drocourt E., Vongsouthi V., Durant L., Moreau F., Verhey T.B., Lee T.W., Junop M.S., Gerusz V. (2013) Novel HldE-K inhibitors leading to attenuated gram negative bacterial virulence. *J. Med. Chem.* **56**, 1418–1430. <https://doi.org/10.1021/jm301499r>
- Desroy N., Moreau F., Briet S., Frallie G.L., Floquet S., Durant L., Vongsouthi V., Gerusz V., Denis A., Escaich S. (2009) Towards gram-negative antivirulence drugs: new inhibitors of HldE kinase. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1276–1289. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.12.021>
- Durka M., Tikad A., Périon R., Bosco M., Andalousi M., Floquet S., Malacain E., Moreau F., Oxoby M., Gerusz V., Vincent S.P. (2011) Systematic synthesis of inhibitors of the two first enzymes of the bacterial heptose biosynthetic pathway: towards antivirulence molecules targeting lipopolysaccharide biosynthesis. *Chemistry.* **17**, 11305–11313. <https://doi.org/10.1002/chem.201100396>

20. Valvano M.A. (1999) Biosynthesis and genetics of ADP-heptose. *J. Endotoxin Res.* **5**, 90–95.
<https://doi.org/10.1177/09680519990050010901>
21. Pagnout C., Sohm B., Razafitianamaharavo A., Caillet C., Offroy M., Leduc M., Gendre H., Jomini S., Beaussart A., Bauda P., Duval J.F.L. (2019) Pleiotropic effects of *rfa*-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Sci. Rep.* **9**, 9696.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46100-3>
22. Shimada T., Takada, H., Yamamoto K., Ishihama A. (2015) Expanded roles of two-component response regulator OmpR in *Escherichia coli*: genomic SELEX search for novel regulation targets. *Genes to Cells.* **20**, 915–931.
<https://doi.org/10.1111/gtc.12282>
23. Fu D., Wu J., Gu Y., Li Q., Shao Y., Feng H., Song X., Tu J., Qi K. (2022) The response regulator OmpR contributes to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Poultry Sci.* **101**, 101757.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101757>
24. Jubelin G., Vianney A., Beloin C., Ghigo J.M., Lazzaroni J.C., Lejeune P., Dorel C. (2005) CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 2038–2049.
<https://doi.org/10.1128/jb.187.6.2038-2049.2005>
25. Rome K., Borde C., Taher R., Cayron J., Lesterlin C., Gueguen E., De Rosny E., Rodrigue A. (2018) The two-component system ZraPSR is a novel ESR that contributes to intrinsic antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **430**, 4971–4985.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021>
26. Leonhartsberger S., Huber A., Lottspeich F., Böck A. (2001) The *hydH/G* genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J. Mol. Biol.* **307**, 93–105.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4451>
27. Wang X., Quinn P.J. (2010) Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Progress Lipid Res.* **49**, 97–107.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.06.002>
28. Nikaido H., Vaara M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**, 1–32.
<https://doi.org/10.1128/mr.49.1.1-32.1985>
29. Yethon J.A., Vinogradov E., Perry M.B., Whitfield C. (2000) Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waag* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J. Bacteriol.* **182**, 5620–5623.
<https://doi.org/10.1128/jb.182.19.5620-5623.2000>
30. Beveridge T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–4733.
<https://doi.org/10.1128/jb.181.16.4725-4733.1999>
31. Achouak W., Heulin T., Pagès J.M. (2001) Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 1–7.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10642.x>
32. Nickerson K.P., Chanin R.B., Sistrunk J.R., Rasko D.A., Fink P.J., Barry E.M., Nataro J.P., Faherty C.S. (2017) Analysis of *Shigella flexneri* resistance, biofilm formation, and transcriptional profile in response to bile salts. *Infect. Immun.* **85**, 1–18.
<https://doi.org/10.1128/iai.01067-16>
33. Mohammed Jajere S.A (2019) Review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World.* **12**, 504–521.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
34. Joseph J., Zhang L., Adhikari P., Evans J.D., Ramachandran R. (2023) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in broiler breeders: an overview. *Pathogens.* **12**.
<https://doi.org/10.3390/pathogens12111280>
35. Matsuura M. (2013) Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Front. Immunol.* **4**, 109.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00109>
36. Zhao Y., Shao F. (2015) Diverse mechanisms for inflammasome sensing of cytosolic bacteria and bacterial virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* **29**, 37–42.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.003>
37. Hu X.Y., Yang C., Wang P., Zhang G.L. (2018) ADP-heptose: a new innate immune modulator. *Carbohydrate Res.* **473**.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.12.011>
38. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Targeted Therapy.* **2**, 17023.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
39. Adekoya I.A., Guo C.X., Gray-Owen S.D., Cox A.D., Sauvageau J. (2018) D-glycero- β -D-mannoheptose 1-phosphate and D-glycero- β -D-mannoheptose 1,7-biphosphate are both innate immune agonists. *J. Immunol.* **201**, 2385–2391.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801012>
40. Zhou P., She Y., Dong N., Li P., He H., Borio A., Wu Q., Lu S., Ding X., Cao Y., Xu Y., Gao W., Dong M., Ding J., Wang D.C., Zamyatina A., Shao F. (2018) Alpha-kinase 1 is a cytosolic innate immune receptor for bacterial ADP-heptose. *Nature.* **561**, 122–126.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0433-3>
41. Pagnout C., Sohm B., Razafitianamaharavo A., Caillet C., Offroy M., Leduc M., Gendre H., Jomini S., Beaussart A., Bauda P., Duval J.F.L. (2019) Pleiotropic effects of *rfa*-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Sci. Rep.* **9**, 9696.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46100-3>
42. Krüger A., Grüning N.M., Wamelink M.M., Kerick M., Kirpy A., Parkhomchuk D., Bluemlein K., Schweiger M.R., Soldatov A., Lehrach H., Jakobs C., Ralser M. (2011) The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxidants & Redox Signal.* **15**, 311–324.

- <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3797>
43. Серегина Т.А., Петрушанко И.Ю., Зарипов П.И., Кулешова Ю.Д., Лобанов К.В., Шакулов Р.С., Миткевич В.А., Макаров А.А., Миронов А.С. (2023) Низкомолекулярные тиолы как фактор, усиливающий чувствительность мутантов *Escherichia coli* с нарушенным синтезом ADP-гептозы к антибиотикам. *Молекуляр. биология.* **57**, 995–1005.
 44. Seregina T.A., Petrushanko I.Yu., Zaripov P.I., Shakulov R.S., Sklyarova A.S., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Mironov A.S. (2023) Activation of purine biosynthesis suppresses the sensitivity of *E. coli GmhA* mutant to antibiotics. *Int. J. Mol. Sci.* **24**.
<https://doi.org/10.3390/ijms242216070>
 45. Mieyal J.J., Chock P.B. (2012) Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: focus on S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 471–475.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4454>
 46. Chai Y.C., Mieyal J. (2023) Glutathione and glutaredoxin – key players in cellular redox homeostasis and signaling. *Antioxidants.* **12**, 1553.
<https://doi.org/10.3390/antiox12081553>
 47. Xiong Y., Uys J.D., Tew K.D., Townsend D.M. (2011) S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 233–270.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3540>
 48. Moreau F., Desroy N., Genevard J.M., Vongsouthi V., Gerusz V., Le Fralliec G., Oliveira C., Floquet S., Denis A., Escaich S., Wolf K., Busemann M., Aschenbrenner A. (2008) Discovery of new gram-negative antivirulence drugs: structure and properties of novel *E. coli* WaaC inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4022–4026.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.117>
 49. Milicaj J., Hassan B.A., Cote J.M., Ramirez-Mondragon C.A., Jaunbocus N., Rafalowski A., Patel K.R., Castro C.D., Muthyala R., Sham Y.Y., Taylor E.A. (2022) Discovery of first-in-class nanomolar inhibitors of heptosyltransferase I reveals a new aminoglycoside target and potential alternative mechanism of action. *Sci. Rep.* **12**, 7302.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-10776-x>
 50. Velkov T., Roberts K., Nation R., Thompson P., Li J. (2013) Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old class of antibiotics. *Future Microbiol.* **8**, 711–724.
<https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>
 51. Mahamad Maifiah M., Creek D., Nation R., Forrest A., Tsuji B., Velkov T., Li J. (2017) Untargeted metabolomics analysis reveals key pathways responsible for the synergistic killing of colistin and doripenem combination against *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* **7**, 45527.
<https://doi.org/10.1038/srep45527>

Enzymes of ADP-Heptose Biosynthesis as Targets for the Creation of Broad-Spectrum Antibacterial Drugs

T. A. Seregina^{1,*}, I. Yu. Petrushanko¹, K. V. Lobanov¹,
R. S. Shakulov¹, A. S. Mironov¹

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy
of Sciences Institute, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: tatyana.s82@gmail.com*

Solving the problem of multidrug resistance currently requires the development of non-standard approaches, since the potential for creating new antibiotics is almost exhausted. Controlling the metabolism of a pathogen in order to increase its susceptibility to antibacterial therapy is considered the most promising area of research for the creation of new combination drugs. In recent years, the number of studies devoted to investigation the role of the biosynthesis of the cell wall component ADP-heptose in the sensitivity of bacteria to antibiotics, as well as in the pathogenesis of bacterial infection, has increased. This review examines the main directions of scientific research in the field of use of ADP-heptose and its analogues in the treatment of bacterial infections. The exclusive role of ADP-heptose in the induction of an immune response is known, through the activation of the NF- κ B signaling pathway and the synthesis of pro-inflammatory cytokines. Our latest work has shown that disruption of the synthesis of ADP-heptose and the efflux of sedoheptulose-7-phosphate from the pentose phosphate pathway induces a redox imbalance and completely disorganizes the metabolism of low molecular weight thiols such as hydrogen sulfide, cysteine, glutathione, which makes the bacterial cell extremely vulnerable to the action of antibiotics. We demonstrate that the hypersensitivity of ADP-heptose mutants to a wide range of antibiotics is explained by a new metabolic status rather than by changes in cell wall permeability. Thus, potential inhibitors of ADP-heptose biosynthesis can combine several positive qualities: an immunomodulatory effect and a powerful potentiating effect in combination with antibiotic therapy.

Keywords: Gram-negative bacteria, antibiotics, ADP-heptose synthesis, oxidative stress, cell redox status, inhibitors of ADP-heptose biosynthesis enzymes, antimicrobial adjuvants

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ: ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

© 2024 г. И. С. Сазыкин^а, М. А. Сазыкина^{а, *}, А. Р. Лицевич^а

^аЮжный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, 344006 Россия

*e-mail: samara@sfedu.ru

Поступила в редакцию 19.04.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 06.06.2024 г.

В обзоре рассмотрены вопросы, связанные с распространением генов антибиотикорезистентности в микробных сообществах окружающей среды. Отмечены “горячие точки” адаптивной эволюции, накопления и распространения антибиотикорезистентных бактерий и генетического материала резистентности к антибиотикам. К таким “горячим точкам” относятся антропогенные экосистемы, такие как очистные сооружения муниципальных сточных вод, полигоны твердых коммунальных отходов, животноводческие предприятия и агроценозы. Рассмотрено влияние различных типов поллютантов и биотических факторов на усиление мутагенеза и горизонтального переноса генов резистентности к антибиотикам. Показана роль мобильных генетических элементов в мобилизации и ускоренном распространении детерминант резистентности. Отдельное внимание уделено роли окислительного стресса и стрессовых регулонов, которые активируются для реализации и контроля молекулярно-генетических механизмов адаптивной эволюции бактерий и при горизонтальном распространении генетического материала в бактериальных популяциях. Окислительный стресс выделен как один из основных активаторов дестабилизации генома и адаптивной эволюции бактерий.

Ключевые слова: бактерии, гены антибиотикорезистентности, горизонтальный перенос генов, мутагенез, поллютанты, ксенобиотики, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0026898424060056, **EDN:** HMZHOY

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия значительно увеличилось количество штаммов бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Соответственно сократился репертуар эффективных антибиотиков, пригодных для клинической практики. По этой причине возрос интерес к природным микробиомам как к источникам новых антибиотиков и генов антибиотикорезистентности (АРГ) [1]. С одной стороны, природные микробные сообщества – это источник АРГ ко всем уже применявшимся в клинике и ветеринарии, перспективным и даже еще не открытым антибиотикам естественного происхождения. С другой стороны, разнообразные таксоны микроорганизмов, включая почвенные

бактерии и грибы, служат резервуаром природных антибиотиков [2].

Антибиотики, как средства коммуникации и конкуренции популяций, появились у древних микроорганизмов задолго до того, как они были открыты. Вероятно, и антибиотики, и АРГ эволюционировали в природных микробных сообществах на протяжении миллиардов лет [3]. Хотя именно природные микробиомы – источник и резервуар АРГ, необходимо учитывать, что в окружающую среду постоянно возвращаются штаммы, мутировавшие под действием антибиотиков в антропогенных условиях, подвергшиеся адаптивной эволюции и селективному отбору [4]. Можно сказать, что постоянно происходит круговорот генов резистента между

Сокращения: АПГ – агенты переноса генов; АРБ – антибиотикорезистентные бактерии; АРГ – гены антибиотикорезистентности; АФК – активные формы кислорода; ГПГ – горизонтальный перенос генов; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; МГЭ – мобильные генетические элементы; СОД – супероксиддисмутаза; IS-элементы – инсерционные последовательности; Rif-мутанты – мутанты бактерий, устойчивые к действию рифампицина.

антропогенными микробиомами и природными микробными сообществами.

К настоящему моменту АРГ признаны новым классом антропогенных биологических поллютантов [5, 6], способных самостоятельно распространяться в окружающей среде, испытывающей антропогенный прессинг, и опасных для здоровья человека.

В исследованиях почвенных коллекций за последние 70 лет выявлено, что содержание АРГ в образцах неуклонно растет с расширением производства антибиотиков [7, 8]. Один из ведущих факторов, под влиянием которого растет число и скорость распространения АРГ, — антропогенное загрязнение окружающей среды. Мобилизация АРГ и рост содержания антибиотикорезистентных бактерий (АРБ) в природных экосистемах под влиянием деятельности человека привели к появлению термина “экологическая устойчивость к антибиотикам” [9].

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ АРГ БАКТЕРИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

В настоящее время для исследования распространения и распространения АРГ используют множество подходов, включая методы выделения и изучения чистых культур, разные форматы ПЦР-анализа, ДНК-микрочипы и метагеномику [10]. Эти методы позволяют дать точную количественную и пространственную оценку распространения АРБ и АРГ, а также исследовать генетическое и функциональное разнообразия резистома окружающей среды [11].

В последние годы для определения содержания целевых АРГ в мусоре и фильтрах полигонов твердых коммунальных отходов широко использовали метод количественной ПЦР. Установлено, что гены устойчивости к сульфаниламидам, β -лактамам, тетрациклинам, макролидам, аминогликозидам, фторхинолонам, а также МЛУ присутствуют в клетках бактерий, обнаруженных в бытовых отходах и фильтрах свалок [10].

Однако применение метода ПЦР для исследования АРГ накладывает свои ограничения. Из-за необходимости синтеза и верификации праймеров в одной работе, как правило, исследуют лишь несколько типов АРГ: например, *sul1*, *sul2*, *tetO*, *tetW* и *ermB* [12]. Более того, из-за низкой пропускной способности и систематической ошибки амплификации рутинной и количественной ПЦР комплексный анализ АРГ бактерий, обнаруживаемых на свалках, затруднен.

Метагеномный анализ, основанный на высокопроизводительном секвенировании, — мощ-

ный инструмент, лишенный ограничений ПЦР. Метагеномный анализ успешно использовали для определения АРГ бактерий в активном иле [13] и стоках очистных сооружений [14]. Однако подобных исследований проводится гораздо меньше, чем основанных на применении ПЦР. Zhao с соавт. [15] применили метагеномный подход для изучения спектра и распределения АРГ в бактериях, обитающих в фильтрах свалок 12 городов Китая, и обнаружили 562 АРГ, среди которых доминировали гены резистентности к сульфаниламидам, макролидам-линкозамидам-стрептограмину, аминогликозидам, тетрациклину и МЛУ. Другая группа исследователей на основании метагеномного подхода проанализировала динамику и закономерности изменения спектра АРГ и изучила состав бактериального сообщества при разложении мусора, а также взаимосвязь между АРГ и бактериальными сообществами [16].

Кроме того, по мере роста интереса к изучению резистомов природных и антропогенно измененных микробных сообществ репертуар доступных праймеров для АРГ также увеличивается. Gorecki с соавт. [17] создали базу данных ПЦР-праймеров для обнаружения АРГ бактерий в различных средах. База основана на литературных источниках, поддерживается вручную и включает 629 пар ПЦР-праймеров для АРГ. Таким образом, в настоящее время ПЦР можно использовать для обнаружения АРГ бактерий в различных образцах окружающей среды. С использованием 296 пар праймеров и метода высокопроизводительной количественной ПЦР исследовано содержание АРГ в грунтовых водах полигонов твердых коммунальных отходов [18]. Исползованные праймеры “покрывали” все основные типы АРГ. Наиболее распространены оказались гены МЛУ, а также устойчивости к β -лактамам и тетрациклину.

ИСТОЧНИКИ ПОСТУПЛЕНИЯ АНТРОПОГЕННО ИЗМЕНЕННЫХ АРГ В ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ

Очистные сооружения сточных вод

Одной из наиболее “горячих точек” кратного увеличения количества АРГ и источником поступления АРБ и АРГ в окружающую среду служат очистные сооружения муниципальных сточных вод. Причина кроется в постоянном притоке АРБ, АРГ, антибиотиков, их метаболитов и других поллютантов, высокая плотность бактерий и циркуляция активного ила [19–21].

Муниципальные очистные сооружения принимают для очистки сточные воды, богатые легко метаболизируемым органическим веществом,

которое служит питательной средой микробного сообщества. Кроме того, стоки содержат вещества, вызывающие стресс у бактерий. К таким соединениям относятся продукты органического синтеза, включая ксенобиотики, антибиотики и их метаболиты, а также соли металлов и их соединения. Эти вещества формируют микробиом очистных сооружений – в первую очередь, состоящий из микроорганизмов, устойчивых к стрессу, вызываемому поллютантами [22]. В сочетании с большим количеством питательных субстратов, тесным пространственным контактом бактериальных клеток во флокулах активного ила, стабильными температурой и кислотностью среды вещества-стрессоры также способствуют горизонтальному переносу генетического материала (ГПП), содержащего АРГ [23, 24]. В очистных сооружениях на стадии биологической очистки стоков создаются условия, приводящие к росту бактериальной популяции, устойчивой к стрессовым условиям, включая воздействие антибиотиков.

В сточных водах медицинских учреждений заключен еще больший потенциальный риск повышения экологической антибиотикорезистентности, а значит и биологической опасности [25]. В лечебных стационарах антибиотики используют особенно широко, поэтому их остатки, а также сами АРБ и их гены присутствуют в значительных количествах в стоках этих учреждений, что способствует распространению АРГ в окружающей среде [26].

Животноводство и ветеринария

Животноводство входит в ряд наиболее значимых составляющих адаптивной эволюции, воспроизводства и распространения АРГ, так как примерно половина всех используемых антибиотиков применяется в этой сфере деятельности человека. Самым большим резервуаром АРБ и АРГ является пищеварительная система сельскохозяйственных животных, а их помет служит источником масштабного распространения генетических детерминант резистентности [27–29]. Отходы животноводства служат особенно значимым источником АРГ для агроценозов [30].

Реализуя механизмы горизонтального переноса, АРГ передаются от АРБ, вносимых в почву с навозом, в микробиомы окружающей среды, а затем и условно-патогенным или патогенным штаммам бактерий, что создает проблемы в антибактериальной терапии [31]. Выделяемые организмом животного антибиотики и их метаболиты могут сохранять заметную часть своей активности, что служит фактором селективного давления при распространении как поступающих с навозом АРГ, так и уже существующих в резистоме окружающей среды [32, 33]. Кроме

того, в навозе часто присутствуют металлы, используемые как стимуляторы роста сельскохозяйственных животных, такие как медь и цинк, что может приводить к коселекции генетических детерминант резистентности и усилению распространения АРГ в микробных сообществах даже в отсутствие антибиотиков [34]. Следует учитывать и тот факт, что при стоке с земель агроценозов и их выщелачивании происходит загрязнение поверхностных и грунтовых вод привнесенными с навозом АРБ и АРГ [35, 36].

Хотя микробиомы сельскохозяйственных животных и агроценозов служат одновременно и резервуаром аккумуляции АРГ, и путем их распространения, резистом сельскохозяйственных микробных сообществ в настоящий момент исследован недостаточно полно, чтобы оценить его роль в распространении генетических детерминант резистентности [37, 38].

Полигоны твердых коммунальных отходов

На полигоны твердых коммунальных отходов постоянно поступают и там же аккумулируются антибиотики, АРГ и АРБ [39, 40]. При сбросе бытовых отходов на свалки попадают в большом количестве остатки лекарственных препаратов и дезинфектантов, которые служат мощным фактором селективного давления при отборе АРГ и АРБ. Вещества, обладающие селективным давлением, такие как антибиотики, тяжелые металлы и органические поллютанты, способствуют распространению резистентных к ним бактерий и их закреплению в подобных антропогенных экосистемах. В процессе разложения мусора условия свалки могут благоприятствовать как отбору, так и горизонтальному переносу генетических детерминант резистентности, создавая экологические преимущества АРБ и увеличивая спектр и количество присутствующих в их геноме АРГ [16]. Более того, из-за отсутствия эффективных стратегий очистки фильтратов свалок АРГ могут и дальше распространяться в окружающей среде [10, 41–43].

ОДНА ИЗ ВАЖНЕЙШИХ ПРИЧИН РАСПРОСТРАНЕНИЯ АРГ В ПРИРОДЕ – АНТРОПОГЕННОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

Антропогенное загрязнение способствует эволюции резистентности, увеличению спектра и распределения АРГ в резистоме микробных сообществ окружающей среды. Многие химические вещества, включая органические поллютанты и ксенобиотики, существенно влияют на селективный отбор резистентных штаммов и адаптивную эволюцию детерминант резистентности [44]. Публикуется все больше исследований о влиянии на накопление и рас-

пространение АРБ и АРГ таких веществ, как углеводороды и их галогенированные производные, пестициды, дезинфицирующие средства, металлы и металлоиды [45]. D. Zheng с соавт. [46] также включают питательные вещества, содержащие различные формы углерода, азота и фосфора; органические поллютанты, включая микропластик; температуру и рН в число критических факторов окружающей среды, влияющих на численность АРГ в микробных сообществах. С ростом уровня загрязнения в микробиоме увеличивается также содержание мобильных элементов бактериального генома, таких как интегроны I класса, способствующих распространению АРГ среди патогенных и условно-патогенных бактерий [47].

Распространение, накопление и круговорот клинически и ветеринарно селекционированных АРГ происходит различными путями: при взаимодействии людей с микробиомами сельскохозяйственных животных, через агроценозы и другие антропогенно преобразованные сообщества, а также природную среду [48–50].

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ, СПОСОБСТВУЮЩИХ РАСПРОСТРАНЕНИЮ АРГ В ПРИРОДНЫХ И АНТРОПОГЕННО ПРЕОБРАЗОВАННЫХ МИКРОБИОМАХ

Абиотические факторы

Антибиотики и дезинфектанты. В недавнем прошлом считали, что бактерицидная активность антибиотиков обусловлена индукцией окислительного стресса в микробной клетке. James Imlay [51] привел наиболее системный критический разбор этой гипотезы, рассмотрев ее в аспекте активных форм кислорода (АФК), продуцируемых бактериальной клеткой. Автор указал на многочисленные методические ошибки исследователей, поддерживающих гипотезу АФК-индуцируемой цитотоксичности под действием антибиотиков, и привел доказательства, что при действии летальных доз антибиотика генерируемые в клетке АФК индуцируют, в лучшем случае, бактериостатический эффект.

Такой же эффект дают дезинфектанты. Под действием низких концентраций триклозана, хлорита или йодоуксусной кислоты в бактериальной клетке возникает окислительный стресс, продуцируются АФК и, как следствие, образуются резистентные к различным антибиотикам мутанты [52, 53]. P. Merchel с соавт. [54] описали развитие резистентных к биоцидам мутантов в ходе лабораторной адаптивной эволюции в течение 500 поколений. Авторы отмечали, что при этом эволюционная траектория и тип мутаций,

приводившие к резистентности, определялись свойствами конкретного биоцида, причем некоторые вещества приводили к появлению перекрестной антибиотикорезистентности.

Металлы. Токсичность металлов обусловлена вытеснением и заменой нормальных кофакторов-металлов из металлопротеинов, инактивацией ферментов при реакциях с SH-группами и, как следствие, индукцией окислительного стресса и генерации АФК [55].

Металлы, такие как Cu и Zn, являются важными кормовыми добавками в животноводстве, которые необходимы для здоровья и роста животных. Выделяемые с продуктами жизнедеятельности избытки металлосодержащих добавок вместе с навозом попадают в почву и другие среды, вызывая их загрязнение. Тяжелые металлы могут вызывать стресс и относятся к селективным факторам отбора АРГ посредством корезистентности, перекрестной резистентности и корегуляции, тем самым поддерживая распространение АРГ [56–59]. H. Lin с соавт. [60] оценили уровни тяжелых металлов и содержание АРГ в почве, которую удобряли навозом, содержащим тяжелые металлы. Авторы обнаружили, что с увеличением массы используемого навоза с тяжелыми металлами в почве повышается не только содержание металлов, но и количество АРГ. Это, фактически, прямое свидетельство того, что тяжелые металлы в навозе скота способствуют накоплению и распространению АРГ в почвенном микробиоме.

В работе L. Li и др. [61] продемонстрировано, что мультирезистентность к антибиотикам у бактерий часто сочетается с устойчивостью к металлам (до 25% всех образцов). A. V. Christgen с соавт. [62], проведя метагеномный анализ, показали, что в микробных сообществах систем биологической очистки стоков и мест хранения и переработки коммунальных отходов самыми распространенными генетическими детерминантами мультирезистентности к металлам и антибиотикам (50–80%) служат эффлюксные насосы.

Окислительно-восстановительные соединения и пестициды. Под воздействием редокс-соединений в клетках *Escherichia coli* активируется регулятор ответа на супероксидный стресс – белок SoxR. Клетки в аэробных условиях окислительно-восстановительные соединения генерируют супероксид. Учитывая тот факт, что ген супероксиддисмутазы (СОД) входит в регулон *soxRS*, многие полагали, что именно супероксид является активатором SoxR. Однако Gu & Imlay [63] показали, что активировать SoxR напрямую могут продуцируемые в клетке производные хинонов, эксcretируемые отдельными бактериями

пиоцианины, гербициды (например, паракват), а также широкий спектр природных соединений и ксенобиотиков.

Влиянию пестицидов на бактерии посвящено немного исследований. Так, паракват и атразин, широко применяемые в качестве пестицидов, индуцируют АФК и вызывают у почвенных бактерий окислительный стресс [64]. Недавно установлено, что широко применяемый гербицид глифосат также вызывает в клетках *E. coli* окислительный стресс и усиливает мутагенез, даже в концентрации, в тысячу раз ниже рекомендованной для агротехнического применения [65].

Углеводороды и ксенобиотики. Под воздействием углеводородов различных классов в клетках бактерий *Acinetobacter calcoaceticus* и *Achromobacter xylosoxidans* усиливается генерация супероксида и происходит индукция СОД, а в среде культивирования накапливается перекись водорода [66, 67]. Кроме того, установлено, что актинобактерия *Rhodococcus erythropolis* при инкубации с различными углеводородами усиливает в клетках генерацию супероксид-аниона, а в среде происходит накопление пероксида водорода. Одновременно в клетках *R. erythropolis* индуцируется Fe-СОД и Cu/Zn-СОД, а также активируется SOS-ответ [68].

На начальных стадиях бактериальной деградации углеводородов и ксенобиотиков решающую роль играют оксигеназы. Эти ферменты с расширенной субстратной специфичностью при окислении неоптимальных субстратов могут при шунтировании каталитического цикла генерировать АФК [69]. Генерация эндогенных АФК в значительных количествах приводит к нарушению целостности клеточной мембраны, повреждению белков и ДНК, усилению мутагенеза и ГПГ в процессе биодegradации углеводородов и их производных [70]. Более того, недавно в работе, выполненной нашей группой, продемонстрирована тесная взаимосвязь концентрации биодоступных полиароматических углеводородов в почвах и распространения АРГ в почвенных микробных сообществах [71].

Нанопластик. Действие микро- и нанопластиков на окислительный стресс и генетические процессы в бактериальных клетках в настоящее время практически не исследовано. Посвященные этому вопросу публикации только начинают появляться. В одной из таких работ [72] показано, что частицы полистирола размером 30 нм вызывают в клетках *E. coli* окислительный стресс, в то время как частицы размером 200 нм оказывают слабый эффект. В результате воздействия наночастиц полистирола увеличивалась

доля поврежденной ДНК и уровень мутантов, устойчивых к рифампицину (Rif-мутантов).

Заметим, что микропластик в воде служит эффективным физическим носителем бактерий окружающей среды, в том числе и АРБ, что обеспечивает постоянное поступление АРГ в среду аквакультуры. Гидрофобная поверхность пластика способствует формированию биопленок, которые образуются на частицах микропластика и обеспечивают прочное взаимодействие микроорганизмов с богатой питательными веществами средой. Образование биопленки защищает АРБ, предотвращая воздействие естественного и искусственного (при дезинфекции стоков) ультрафиолетового излучения на микроорганизмы, находящиеся на поверхности частиц микропластика. Таким образом, микропластик – это еще одна “горячая точка” для обмена генами, способствующая распространению АРГ в воде и донных отложениях [73].

Биотические факторы

Механизмы горизонтального переноса генетического материала между бактериями. Распространение устойчивых к антибиотикам штаммов в основном происходит благодаря активности мобильных генетических элементов (МГЭ), способных перемещаться между репликациями или внутри одной молекулы ДНК. Мобилом (совокупность МГЭ микробного сообщества) включает инсерционные последовательности (IS-элементы), интегроны и их генные кассеты, транспозоны, а также МГЭ, которые могут перемещаться между бактериальными клетками: например, плазмиды и интегративные конъюгативные элементы. Мобилом играет центральную роль в ГПГ и, следовательно, способствует приобретению и распространению АРГ [28, 74]. IS-элементы и транспозоны представляют собой дискретные сегменты ДНК, которые могут перемещаться (вместе с содержащимися в них АРГ) в новые сайты в одном и том же или в разных репликациях внутри одной клетки. IS-элементы могут влиять на резистентность к антибиотикам/ксенобиотикам, непосредственно инактивируя гены, кодирующие пути их поглощения. Так, повышенная устойчивость к карбапенемам развивается при транспозиции IS-элементов в гены, кодирующие порин: *oprD* в изолятах *Pseudomonas aeruginosa* и *P. putida*; *carO* в *Acinetobacter baumannii*; *ompE36* в *Enterobacter aerogenes*; *ompK36* в *Klebsiella pneumoniae* [75]. Опубликованы обзоры, посвященные влиянию IS-элементов на фенотипы устойчивости АРБ [28, 75]. Резистентность к неблагоприятным факторам передается посредством ГПГ, важного для адаптивной эволюции бактерий. К основным механизмам горизонтального пе-

реноса у бактерий относятся конъюгация (опосредованная плазмидами и интегративными конъюгативными элементами), трансдукция (опосредованная бактериофагами) и естественная трансформация (поглощение внеклеточной ДНК) [76].

Плазмиды резистентности. Плазмиды относятся к важным носителям МГЭ и АРГ, связанных с ними как в грамотрицательных, так и грамположительных бактериях, а их размер варьирует от тысячи до нескольких миллионов пар нуклеотидов [77]. В плазмидах резистентности области, несущие АРГ, обычно состоят из одного или нескольких генов и связанных с ними МГЭ, описанных выше (IS-элементов, транспозонов и интегронов) [28]. Увеличение количества плазмид происходит не только за счет вертикальной передачи при делении клеток, но и за счет горизонтальной передачи другим бактериальным клеткам.

Д. Мао с соавт. [78] обнаружили, что при внесении канамицина в среду, содержащую плазмиды и внеклеточную ДНК с включенными в нее АРГ, скорость поглощения генов резистентности из внеклеточного материала становится в два раза выше, чем в отсутствие канамицина. В тех же условиях канамицинового стресса, без внесения плазмид, трансформации АРГ не наблюдали. Аналогичные результаты были получены Jutkina и др. [79] при стрессе, вызванном тетрациклином, гентамицином, сульфаметоксазолом, хлоргексидином и триклозаном.

Показано, что плазмиды играют крайне важную роль в распространении АРГ [80], в том числе облегчая перенос интегративных и конъюгативных МГЭ [81].

Бактериофаги. Бактериофаги – это вирусы, заражающие бактерии и размножающиеся внутри них. Фаги могут переносить ДНК от одной бактерии к другой посредством генетической трансдукции. Антагонистическая коэволюция между бактериями и бактериофагами играет ключевую роль в обеспечении и поддержании микробного разнообразия [82]. Бактериофаги считаются наиболее распространенными агентами межклеточного ГПГ. Фаговая трансдукция – основной способ приобретения бактериями факторов вирулентности и устойчивости к антибиотикам, которую считают основной движущей силой эволюции микробов [74].

Недавно J. Chen с соавт. [83] предложили модель латеральной трансдукции, которая может быть эффективным средством переноса больших сегментов бактериальных хромосом (длинной в сотни тысяч пар нуклеотидов) от одной бактерии к другой с чрезвычайно высокой час-

тотой. С открытием этого механизма ГПГ становится более понятна быстрая эволюция бактерий, в том числе появление штаммов с МЛУ. Так, фаговый элемент Φ HKU.vir, несущий гены суперантигена (*ssa*), орнитиндекарбоксилазы (*speC*) и ДНКазы (*spdI*), вызвал появление МЛУ у бактерий *Streptococcus pyogenes* генотипа emm12 [84]. Фаги, интегрировавшие в бактериальную хромосому, могут быть активированы либо спонтанно, либо при индукции SOS-ответа в клетке. После индукции фаг вступает в литический цикл, приводящий к образованию потомства и в конечном счете к лизису клеток-хозяев. Во время литического цикла бактериальная ДНК (а не фаговая) может быть упакована в капсид фага с образованием трансдукционной частицы, которая при высвобождении из клетки-хозяина (донора) переносит бактериальную ДНК в другую клетку (реципиент) [85]. Известно, что в окружающей среде присутствует множество фагов, несущих АРГ. Это позволяет предположить, что бактериофаги могут быть векторами микробных сообществ, активно переносящими АРГ. Фаги часто заражают бактерии в системах обработки отходов [86], где штаммы, несущие АРГ, более адаптированы к локальным условиям и поэтому становятся доминирующими.

Существенным фактором распространения резистентности бактериофагами является то, что применяемые в настоящее время технологии дезинфекции, такие как УФ-облучение и хлорирование, крайне слабо инактивируют фаговые фракции АРГ [87, 88]. Следовательно, активное размножение бактериофагов в АРБ является фактором поддержания пула АРГ в системах очистки и переработки отходов. Бактериофаги, несущие АРГ, поступают из очистных сооружений в окружающую среду вместе со стоками, где они могут трансдуцировать АРГ в микробные сообщества, ранее от них свободные [89].

Агенты переноса генов. Агенты переноса генов (АПГ) представляют собой фагоподобные частицы, содержащие ДНК, продуцируемые некоторыми видами бактерий и архей [90]. АПГ, впервые описанные в семидесятых годах прошлого века, представляют собой небольшие частицы, которые могут переносить любые случайные сегменты генома бактерий-хозяев между клетками [91]. Интересно, что для образования АПГ не требуется никакого предварительного заражения бактериального хозяина трансдуцирующим фагом. Это связано с тем, что гены, кодирующие капсиды АПГ, своего рода контейнер для мобилизации бактериальной ДНК, уже присутствуют в бактериальной хромосоме [92]. АПГ – необычный инструмент ГПГ, который можно рассматривать как гибрид фаговой трансдукции и естественной трансформации [93]. Передаваемые через АПГ гены могут повышать приспособ-

собляемость или экологическую устойчивость бактерии, а также приводит к развитию антибиотикорезистентности. Можно утверждать, что этот процесс полезен на популяционном уровне, способствуя адаптивной эволюции систем хозяина и тем самым увеличивая размер его ареала [94]. АПГ обладают потенциалом стимулировать эволюцию бактерий и пластичность генома, включая распространение генов вирулентности и антибиотикорезистентности. Доза АПГ, или множественность инфекции, линейно коррелировала с повышенной устойчивостью к антибиотикам. В экосистеме коралловых рифов частота генов АПГ-опосредованной устойчивости к канамицину оказалась значительно выше, чем частота спонтанной устойчивости [95].

Хорошо изученная система АПГ принадлежит пурпурно-несерной морской бактерии *Rhodobacter capsulatus* [96]. P. Bárdy с соавт. [97] установили, что структура АПГ *R. capsulatus* напоминает морфологию хвостатого фага со сплюснутой головкой, укороченной в направлении оси хвоста, что ограничивает его упаковочную способность до менее 4500 п.н. линейной двухцепочечной ДНК. Хвостовой канал содержит тримерные белки, которые сжимаются и выбрасывают ДНК в бактериальный перипласт. Обнаружены и другие формы АПГ. Так, *Brachyspira hyodysenteriae* продуцирует АПГ-подобные частицы, классифицируемые как сифовирусный тип и названные VSH-1 [98]. Известно, что частицы VSH-1 опосредуют перенос различных маркеров между клетками, включая гены вирулентности и устойчивости к антибиотикам [99]. Кроме того, обнаружено, что клетки *Bacillus* spp. продуцируют фагоподобные частицы PBSX, *Desulfovibrio desulfuricans* – частицы Dd1, а археи *Methanococcus voltae* – частицы VTA. Все они участвуют в ГПГ [99].

РЕГУЛОНЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ГЕНОМА, УСИЛЕНИИ МУТАГЕНЕЗА И ГОРИЗОНТАЛЬНОМ ПЕРЕНОСЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

При взаимодействии бактерий с поллютантами и ксенобиотиками возникающий в клетке окислительный стресс приводит к повреждению ДНК. Повреждения, полученные бактериальной клеткой в результате окислительного стресса, в свою очередь активируют стрессовые регулоны, влияющие на стабильность генома и усиливающие его изменчивость. Этот адаптивный ответ возникает в результате индукции SOS-ответа, RpoS и RpoE регулонов. В микробном сообществе возрастает уровень мутагенеза, рекомбинаций ГПГ, что приводит к дестабилизации генома и ускорению адаптивной эволюции.

Осознание важности окислительного стресса как универсального механизма индукции генетической изменчивости, ускоряющей отбор клонов, более адаптированных к меняющемуся химическому окружению бактериальной клетки, требует рассмотрения этих регулонов.

SOS-регулон

При окислительном повреждении ДНК, а также при репликации ДНК с окислительными повреждениями образуются участки одноцепочечной ДНК. Каскад молекулярных событий при развитии SOS-ответа хорошо изучен на модели *E. coli* и обстоятельно описан в обзоре Baharoglu и Mazel [100]. Регулируемые SOS-ответом гены участвуют в репарации поврежденной ДНК. SOS-ответ бактерий регулирует три основных пути восстановления ДНК. Это эксцизионная репарация нуклеотидов, гомологичная рекомбинация и транслезионный синтез ДНК. Гомологичная рекомбинация, наряду с заменой поврежденных участков ДНК, может приводить к перестройкам бактериальной хромосомы путем рекомбинации между сходными нуклеотидными последовательностями, в том числе полученными клеткой в результате ГПГ. Транслезионную репарацию (мутагенную репликацию поврежденной ДНК) реализуют склонные к ошибкам ДНК-полимеразы: PolIV (ген *dinB*), PolV (гены *umuCD*) и PolIII (ген *polB*). Для высокоточной ДНК-полимеразы PolIII нуклеотиды с окислительными повреждениями становятся препятствием. PolIII не в состоянии строить комплементарную цепь на поврежденной матрице и останавливает репликацию ДНК, в то время как транслезионные полимеразы продолжают реплицировать ДНК на поврежденных участках; при этом PolIV и PolV напротив нуклеотидов с окислительными повреждениями встраивают любое основание [101, 102]. В результате транслезионной репарации увеличивается частота мутаций, так как напротив поврежденного нуклеотида матричной цепи может быть включено некомплементарное основание.

К появлению устойчивых к антибиотикам изолятов могут приводить точечные мутации. Установлено, что в присутствии антибиотика, даже в субминимальной ингибирующей концентрации, в клетках *E. coli* и *Vibrio cholerae* развивается окислительный стресс с индукцией SOS-ответа, вызывающего усиление мутагенеза. Частота возникновения Rif-мутантов при этом увеличивается на порядок: с 10^{-9} до 10^{-8} [103].

Индукцированный образованием двунитевых разрывов ДНК SOS-ответ может обеспечить бактерии в неблагоприятных условиях дополнительное преимущество. При исследовании бактериальных биопленок *P. aeruginosa* выявлено, что

двухцепочечные разрывы ДНК в присутствии антибиотика “полезны” для бактерий, так как в результате SOS-ответа происходили перестройки генома и возникали резистентные изоляты [104].

Х. Chen и др. [105] показали, что УФ-облучение, вызывая окислительный стресс, индуцирует SOS-ответ и значительно усиливает конъюгативный перенос АРГ. SOS-ответ, индуцировав гомологическую рекомбинацию, может привести к перестройке интегров и, как следствие, к развитию МЛУ. Показано, что обработка метронидазолом патогенного штамма *P. aeruginosa* вызывала SOS-индуцированную рекомбинацию интегров и приводила к резистентности к β -лактамам и цефтазидиму [106].

Наряду с усилением мутагенеза и рекомбинации, SOS-индукция активирует ГПГ даже между разными таксонами бактерий. Так, SOS-ответ индуцирует перенос интегративных конъюгативных мобильных элементов, играющих важную роль в распространении АРГ в микробных сообществах [100].

Еще один механизм ГПГ – трансформация, которая происходит при поглощении и интеграции в свой геном фрагментов внеклеточной ДНК бактериями. Трансформация происходит в состоянии компетентности, когда бактериальная клетка становится способной поглощать и процессировать одноклеточную ДНК из окружающей среды. У некоторых бактерий, лишенных SOS-регулона, компетентность является стресс-ответом и, вероятно, заменяет собой SOS-ответ. Регулон компетентности таких бактерий включает гены репарации ДНК [100]. Состояние компетентности возникает в ответ на стресс у многих бактерий, что позволяет предположить, что компетентность, по крайней мере в некоторых случаях, – альтернатива SOS-ответу.

ГПГ играет важную роль в освоении новых экологических ниш бактериями. Этот процесс обеспечивает значительную генетическую вариабельность [107] и преодоление межвидовых барьеров новыми генетическими функциями и свойствами [108, 109], ускоряющими адаптивную эволюцию бактерий под давлением изменившихся условий окружающей среды [110]. Важно, что вклад ГПГ в адаптивную эволюцию бактерий значительно превосходит мутагенез [111].

Регулон RpoS

RpoS – это сигма-фактор РНК-полимеразы, регулятор экспрессии генов общего стрессового ответа и генов стационарной фазы [112]. RpoS, вероятно, контролирует экспрессию транслезион-

ных ДНК-полимераз в еще большей степени, чем SOS-ответ. Все сказанное о роли и механизмах действия транслезионных полимераз в увеличении генетической изменчивости и ускорении эволюции бактерий в условиях стресса верно и для RpoS-регулона. В клетках *E. coli* гены *dinB*, *umuCD* и *polB* входят в состав SOS- и RpoS-регулонов и имеют сходную регуляцию экспрессии при этих двух стресс-ответах [113].

При индукции RpoS ципрофлоксацином и одновременном окислительном стрессе в популяции *E. coli* установлено образование субпопуляций клеток, имеющих разную частоту образования Rif-мутантов [114]. Значительное усиление мутагенеза выявлено только для субпопуляций с одновременно повышенным уровнем АФК и RpoS. Субпопуляция с высоким уровнем Rif-мутантов также активно образовывала мультихромосомные клеточные филаменты, в которых репликация бактериальной хромосомы опережала разделение на отдельные клетки. В таких мультихромосомных филаментах негативные эффекты множественных мутаций, вероятно, смягчались рекомбинацией и наличием немутировавших аллелей [115], что увеличивало количество выживших клеток потомства.

Регулон RpoE

Окислительный стресс в бактериальной клетке активирует также регулон RpoE. Однако роль этого регулона в изменении уровня мутагенеза/ГПГ и его влияние на адаптивную эволюцию прокариот практически не исследована.

Известно, что RpoE-регулон *Rhodobacter sphaeroides* активируется синглетным кислородом, который атакует антитранскрипционный фактор ChR, образующий комплекс с RpoE, и высвобождает активный RpoE [116, 117]. RpoE-регулон, несмотря на небольшие размеры, включает два дополнительных сигма-фактора: RpoHI и RpoHII [118, 119]. В свою очередь эти сигма-факторы активируют гены ответа на стресс, вызываемый синглетным кислородом; при этом каскад факторов транскрипции RpoE/RpoHI/II регулирует ряд малых регуляторных РНК [120, 121]. Установлено, что экспрессия ферредоксина, рубреритрина и спермидин-ацетилтрансферазы, имеющих большое значение для повышения устойчивости к окислительным повреждениям клетки, регулируется RpoE [122]. Таким образом, сеть ответа регулона RpoE на окислительный стресс достаточно обширна и пока далека от полной ясности, а для понимания физиологической роли RpoE в разных

таксонах микроорганизмов необходимы дальнейшие исследования.

МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ АРГ В ПРИСУТСТВИИ ПОЛЛЮТАНТОВ

Окислительный стресс индуцирует мутагенез, рекомбинацию и ГПГ. При этом стрессовая дестабилизация генома, по-видимому, ускоряет генетическую адаптацию, в том числе взаимодействие патогенных бактерий с хозяином, а также распространение резистентности к антибиотикам. Скорее всего, окислительный стресс относится к важнейшим механизмам бактериальной эволюции в целом. Можно привести много примеров влияния антибиотиков и дезинфектантов на генетическую адаптацию микроорганизмов. Есть публикации, посвященные дестабилизации бактериального генома под воздействием других соединений, таких как углеводороды различных классов и их производные, а также ксенобиотики. Однако работ таких немного и пока мало изучено действие этих соединений на геном микроорганизмов.

В эксперименте по лабораторной эволюции *E. coli* в течение 100 поколений М. Li и соавт. [53] показали, что низкие дозы триклозана индуцировали повышенную резистентность клеток бактерий к данному дезинфектанту — для подавления их роста требовались концентрации, в десятки раз превышающие первоначальные. Эти изменения, по данным транскриптомного и геномного анализа, произошли из-за мутаций и сверхэкспрессии ряда генов-мишеней (*fabI*, *fabB*, *fabD* и *fabZ*). Более того, бактерии приобрели устойчивость к ряду антибиотиков. При дальнейшем выращивании на среде без триклозана устойчивость к нему сохранялась в течение всего времени эксперимента, в то время как антибиотикорезистентность со временем падала.

На примере дефектных по каталазе *KatA* бактерий *P. aeruginosa* продемонстрирована роль АФК в возникновении антибиотикорезистентных изолятов. При выращивании биопленок *P. aeruginosa* $\Delta katA$ в среде, содержащей субминимальные ингибирующие концентрации ципрофлоксацина, выделена резистентная к этому антибиотику субпопуляция клеток, количественно значительно превосходящая таковую из популяции клеток дикого типа [123].

Различные органические поллютанты и ксенобиотики также оказывают сильное влияние на дестабилизацию бактериального генома. Так, при окислительном стрессе, индуцированном присутствием фенола в качестве единственного источника углерода, в клетках *P. putida* усилива-

лась частота АФК-стимулированной гомологичной рекомбинации [124]. В результате перестроек генома, индуцированных стрессовой рекомбинацией, к клеткам данного штамма *P. putida* возвратилась способность к биодеградации фенола.

Исследовательская группа под руководством V. de Lorenzo [70] изучала гены катаболизма 2,4-динитротолуола (2,4-ДНТ) штамма *Burkholderia* sp. R34, выделенного из почвы полигона, на котором использовали взрывчатые вещества. Ими показано, что начальный этап биотрансформации идет под действием нафталин-1,2-диоксигеназы, кодируемой геном *dntA*. Этот фермент может окислять как нафталин, так и 2,4-ДНТ, причем в обоих случаях диоксигеназа производит АФК в значительных количествах. Это происходит из-за того, что и 2,4-ДНТ, и нафталин относятся к субоптимальным субстратам этого фермента. В результате ферментативный цикл часто шунтируется с образованием АФК. Согласно гипотезе авторов, диоксигеназа проходит адаптивную эволюцию при смене субстрата от нафталина к 2,4-ДНТ. При этом генерируемые ферментом АФК дестабилизируют бактериальный геном, стимулируют мутагенез и, следовательно, генетическую изменчивость.

В дальнейших исследованиях этой группы ученые гены катаболизма 2,4-ДНТ из *Burkholderia* sp. R34 были клонировали в штамм *P. putida* EM173 [125]. Клетки *P. putida* EM173 при утилизации 2,4-ДНТ также генерировали АФК и подвергались окислительному стрессу, но при этом не происходило ни индукции SOS-ответа, ни усиления мутагенеза. Видимо, это обусловлено высокими концентрациями низкомолекулярных антиоксидантов, особенно NADFH, в клетках псевдомонад. Усиления мутагенеза в 6 раз удалось добиться только при использовании NADF-специфичной оксидазы, позволившей снизить уровень NADFH внутри бактериальной клетки.

Впоследствии те же клонированные гены метаболизма 2,4-ДНТ были перенесены в *E. coli* [126]. При биотрансформации данного соединения в клетках кишечной палочки также возникал окислительный стресс, под действием которого возрастал уровень мутагенеза. Авторы установили, что в клетках *E. coli* транслезионную репликацию ДНК индуцировал RpoS-регулон, а не SOS-ответ. Таким образом, ферментативная трансформация одного и того же соединения, в вышеописанных работах 2,4-ДНТ, при которой происходит генерация АФК, у разных бактерий может приводить к различным сценариям адаптивной эволюции, определяемым особенностями окислительно-восстановитель-

ного метаболизма и антиоксидантной защиты клетки-хозяина.

Стоит заметить, что различные субстраты, при утилизации которых возникает окислительный стресс, могут приводить к активации сходных адаптивных и защитных механизмов в бактериальной клетке. Так, клетки *R. erythropolis* сходным образом реагировали на окислительный стресс, индуцированный различными углеводородами: циклогексаном, нафталином и дизельным топливом [68]. В присутствии всех вышеперечисленных субстратов в бактериальной клетке увеличивалась генерация супероксид-анион радикала и усиливалась транскрипция генов *sodA* (СОД), *sup153* (цитохром семейства P450) и *recA* (регулятор SOS-ответа). Возможно, при окислении этих углеводородов адаптивный ответ *R. erythropolis* индуцируется SOS-ответом.

Также зарегистрировано усиление образования антибиотикорезистентных мутантов при воздействии наночастиц полистирола в диапазоне концентраций от 0.25 до 16 мг/л [72]. Интересно, что максимальная частота мутаций, вызванных нанополлестиролом, составляла 400% от контроля. Авторы продемонстрировали, что амино-модифицированный полистирол индуцирует SOS-ответ, в том числе экспрессию генов *dinB*, *mutS* и *uvrD*. Немодифицированные наночастицы также стимулировали гены репарации ДНК, включая транслезионную полимеразу *dinB*, однако индукции SOS-ответа при этом не происходило. По-видимому, в этом случае транслезионную репарацию индуцировал другой стрессовый регулон.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение антибиотиков приводит к колонизации кишечника человека и животных устойчивыми к антибиотикам штаммами, гены которых, АРГ, распространяются через ГПГ в другие микроорганизмы кишечника. Это приводит к передаче АРГ условно-патогенным микроорганизмам и развитию МЛУ у многих патогенов. АРБ переносят гены устойчивости в окружающую среду через экскременты животных и человека и далее в природные экосистемы. В окружающей среде распространение и поддержание АРГ стимулируется различными поллютантами. В итоге АРГ из природных и антропогенных экосистем могут возвращаться и далее циркулировать среди животных, в человеческой популяции и в окружающей среде.

Какой из вариантов стресс-ответа (SOS-ответ, PpoS - или PpoE -регулон) будет управлять механизмами генетической адаптации в целом и распространением АРГ в частности, а также насколько окислительный стресс будет влиять

на перестройки генома, ГПГ и уровень мутагенеза, по-видимому, зависит от таксономической принадлежности, особенностей антиоксидантной защиты, редокс-метаболизма и взаимодействия стрессовых регулонов конкретного микроорганизма. Однако не вызывает сомнения, что окислительный стресс – универсальный жесткий (с повреждением клеточных компонентов и сокращением бактериальной популяции) механизм адаптивной дестабилизации бактериального генома, приводящий к ускорению эволюции микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в сфере научной деятельности (№ FENW-2023-0008).

Этические нормы соблюдены. Обзор написан с использованием открытых публикаций. Статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walsh F., Duffy B. (2013) The culturable soil antibiotic resistome: a community of multi-drug resistant bacteria. *PloS One*. **8**(6), e65567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065567>
- Pepper I.L. (2013) The soil health-human health nexus. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **43**(24), 2617–2652. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.694330>
- Adu-Oppong B., Gasparrini A.J., Dantas G. (2017) Genomic and functional techniques to mine the microbiome for novel antimicrobials and antimicrobial resistance genes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1388**(1), 42–58. <https://doi.org/10.1111/nyas.13257>
- Hu Y., Yang X., Li J., Lv N., Liu F., Wu J., Lin I. Y., Wu N., Weimer B. C., Gao G. F., Liu Y., Zhu B. (2016) The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**(22), 6672–6681. <https://doi.org/10.1128/AEM.01802-16>
- Hsu C., Hsu B., Ji W., Chen J., Hsu T., Ji D., Tseng S., Chiu Y., Kao P., Huang Y. (2015) Antibiotic resistance pattern and gene expression of nontyphoid *Salmonella* in riversheds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 7843–7850. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4033-y>
- Pruden A., Pei R., Storteboom H., Carlson K. H. (2006) Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7445–7450. <https://doi.org/10.1021/es060413l>
- Graham D.W., Knapp C.W., Christensen B.T., McCluskey S., Dolfing J. (2016) Appearance of beta-lac-

- tam resistance genes in agricultural soils and clinical isolates over the 20th century. *Sci. Rep.* **6**(1), 21550. <https://doi.org/10.1038/srep21550>
8. Knapp C.W., Dolfing J., Ehler P.A., Graham D.W. (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.* **44**(2), 580–587. <https://doi.org/10.1021/es901221x>
 9. Gaze W.H., Krone S.M., Joakim Larsson D.G., Li X.Z., Robinson J.A., Simonet P., Smalla K., Timinouni M., Topp E., Wellington E.M., Wright G.D., Zhu Y.G. (2013) Influence of humans on evaluation and mobilization of environmental antibiotic resistance. *Emerging Infect. Dis.* **19**(7), e120871. <https://doi.org/10.3201/eid1907.120871>
 10. Zhang R., Yang S., An Y., Wang Y., Lei Y., Song, L. (2022) Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: a review. *Sci. Total Environ.* **806**(2), 150647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150647>
 11. Nowrotek M., Jalowiecki L., Harnisz M., Plaza G.A. (2019) Culturomics and metagenomics: in understanding of environmental resistome. *Front. Environ. Sci. Eng.* **13**, 12. <https://doi.org/10.1007/s11783-019-1121-8>
 12. Li B., Yang Y., Ma L.P., Ju F., Guo F., Tiedje J.M., Zhang T. (2015) Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J.* **9**, 2490–2502. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.59>
 13. Yang Y., Li B., Ju F., Zhang T. (2013) Exploring variation of antibiotic resistance genes in activated sludge over a four-year period through a metagenomic approach. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 10197–10205. <https://doi.org/10.1021/es4017365>
 14. Yang Y., Li B., Zou S.C., Fang H.H.P., Zhang T. (2014) Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Res.* **62**, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.019>
 15. Zhao R.X., Feng J., Yin X.L., Liu J., Fu W.J., Berendonk T.U., Zhang T., Li X., Li B. (2018) Antibiotic resistome in landfill leachate from different cities of China deciphered by metagenomic analysis. *Water Res.* **134**, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.063>
 16. Liu X., Yang S., Wang Y.Q., Zhao H.P., Song L.Y. (2018) Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes (ARGs) during refuse decomposition. *Sci. Total Environ.* **634**, 1231–1237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.048>
 17. Gorecki A., Decewicz P., Dziurzynski M., Janeczko A., Drewniak L., Dziewit L. (2019) Literature-based, manually-curated database of PCR primers for the detection of antibiotic resistance genes in various environments. *Water Res.* **161**, 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.009>
 18. Chen Q.L., Li H., Zhou X.Y., Zhao Y., Su J.Q., Zhang X., Huang F.Y. (2017) An underappreciated hotspot of antibiotic resistance: the groundwater near the municipal solid waste landfill. *Sci. Total Environ.* **609**, 966–973. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.164>
 19. Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M.C., Michael I., Fatta-Kassinos D. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* **447**, 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
 20. Ferro G., Guarino F., Castiglione S., Rizzo L. (2016) Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H₂O₂ process. *Sci. Total Environ.* **560–561**, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.047>
 21. Manaia C.M., Rocha J., Scaccia N., Marano R., Radu E., Biancullo F., Cerqueira F., Fortunato G., Iakovides I.C., Zammit I., Kampouris I., Vaz-Moreira I., Nunes O.C. (2018) Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. *Environ. Int.* **115**, 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.044>
 22. Manaia C.M., Macedo G., Fatta-Kassinos D., Nunes O.C. (2016) Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 1543–1557. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7202-0>
 23. Di Cesare A., Fontaneto D., Doppelbauer J., Corno G. (2016) Fitness and recovery of bacterial communities and antibiotic resistance genes in urban wastewaters exposed to classical disinfection treatments. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 10153–10161. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02268>
 24. Kim S., Yun Z., Ha U.H., Lee S., Park H., Kwon E.E., Cho Y., Choung S., Oh J., Medriano C.A., Chandran K. (2014) Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative micro-contaminant concentrations. *Sci. Total Environ.* **468–469**, 813–820. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.100>
 25. Carraro E., Bonetta S., Bertino C., Lorenzi E., Bonetta S., Gilli G. (2016) Hospital effluents management: chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. *J. Environ. Manage.* **168**, 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.021>
 26. Harris S.J., Cormican M., Cummins C. (2012) Antimicrobial residues and antimicrobial-resistant bacteria: impact on the microbial environment and risk to human health – a review. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **18**, 767–809. <https://doi.org/10.1080/10807039.2012.688702>
 27. Woolhouse M., Ward M., van Bunnik B., Farrar J. (2015) Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**, 20140083. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>
 28. Gu Y., Shen S., Han B., Tian X., Zhang K. (2020) Family livestock waste: an ignored pollutant resource of antibiotic resistance genes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **197**, 110567.

- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110567>
29. Wang Y., Hu Y., Liu F., Cao J., Gao G.F. (2020) Integrated metagenomic and metatranscriptomic profiling reveals differentially expressed resistomes in human, chicken, and pig gut microbiomes. *Environ. Int.* **138**, 105649. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105649>
 30. Brooks J.P., McLaughlin M.R., Gerba C.P., Pepper I.L. (2012) Land application of manure and Class B biosolids: an occupational and public quantitative microbial risk assessment. *J Environ. Qual.* **41**(6), 2009–2023. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0430>
 31. Lin H., Zhang J., Chen H., Wang J., Sun W., Zhang X., Yang Y., Wang Q., Ma J. (2017) Effect of temperature on sulfonamide antibiotics degradation, and on antibiotic resistance determinants and hosts in animal manures. *Sci. Total Environ.* **607–608**, 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.057>
 32. Thanner S., Drissner D., Walsh F. (2016) Antimicrobial resistance in agriculture. *mBio.* **7**, e02227–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02227-15>
 33. Xie W.Y., Shen Q., Zhao F.J. (2018) Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *Eur. J. Soil Sci.* **69**, 181–195. <https://doi.org/10.1111/ejss.12494>
 34. Yazdankhah S., Rudi K., Bernhoft A. (2014) Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microb. Ecol. Health Dis.* **25**, 1. <https://doi.org/10.3402/mehd.v25.25862>
 35. Kivits T., Broers H.P., Beeltje H., van Vliet M., Griffioen J. (2018) Presence and fate of veterinary antibiotics in age-dated groundwater in areas with intensive livestock farming. *Environ. Pollut.* **241**, 988–998. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.085>
 36. Manyi-Loh C.E., Mamphweli S.N., Meyer E.L., Makaka G., Simon M., Okoh A.I. (2016) An overview of the control of bacterial pathogens in cattle manure. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **13**(9), 843. <https://doi.org/10.3390/ijerph13090843>
 37. Xiao R., Huang D., Du L., Song B., Yin L., Chen Y., Gao L., Li R., Huang H., Zeng G. (2023) Antibiotic resistance in soil-plant systems: a review of the source, dissemination, influence factors, and potential exposure risks. *Sci. Total Environ.* **869**, 161855. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161855>
 38. Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health.* **109**, 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
 39. Song L.Y., Li L., Yang S., Lan J.W., He H.J., McElmurry S.P., Zhao Y. (2016) Sulfamethoxazole, tetracycline and oxytetracycline and related antibiotic resistance genes in a large-scale landfill, China. *Sci. Total Environ.* **551**, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.007>
 40. Wang Y.Q., Tang W., Qiao J., Song L.Y. (2015) Occurrence and prevalence of antibiotic resistance in landfill leachate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 12525–12533. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4514-7>
 41. Wang J.Y., An X.L., Huang F.Y., Su J.Q. (2020) Antibiotic resistome in a landfill leachate treatment plant and effluent-receiving river. *Chemosphere.* **242**, 8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125207>
 42. Wu D., Ma R.Q., Wei H.W., Yang K., Xie B. (2018) Simulated discharge of treated landfill leachates reveals a fueled development of antibiotic resistance in receiving tidal river. *Environ. Int.* **114**, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.049>
 43. Wu Y., Cui E., Zuo Y., Cheng W., Chen H. (2018) Fate of antibiotic and metal resistance genes during two-phase anaerobic digestion of residue sludge revealed by metagenomic approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**, 13956–13963. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1598-x>
 44. An X.L., Su J.Q., Li B., Ouyang W.Y., Zhao Y., Chen Q.L., Cui L., Chen H., Gillings M.R., Zhang T., Zhu Y.G. (2018) Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR. *Environ. Int.* **117**, 146–153. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2018.05.011>
 45. Wang J., Wang J., Zhao Z., Chen J., Lu H., Liu G., Zhou J., Guan X. (2017) PAHs accelerate the propagation of antibiotic resistance genes in coastal water microbial community. *Environ. Pollut.* **231**, 1145–1152. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.07.067>
 46. Zheng D., Yin G., Liu M., Chen C., Jiang Y., Hou L., Zheng Y. (2021) A systematic review of antibiotics and antibiotic resistance genes in estuarine and coastal environments. *Sci. Total Environ.* **777**, 146009. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.146009>
 47. Gillings M.R., Gaze W.H., Pruden A., Smalla K., Tiedje J.M., Zhu Y.G. (2015) Using the class I integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* **9**(6), 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
 48. Berendonk T.U., Manaia C.M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Walsh F., Bürgmann H., Sørum H., Norström M., Pons M.N., Kreuzinger N., Huovinen P., Stefani S., Schwartz T., Kisand V., Baquero F., Martinez J.L. (2015) Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
 49. Storteboom H., Arabi M., Davis J.G., Crimi B., Pruden A. (2010) Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. *Environ. Sci. Technol.* **44**(6), 1947–1953. <https://doi.org/10.1021/es902893f>
 50. Sazykin I.S., Seliverstova E.Yu., Khmelevtsova L.E., Azhogina T.N., Kudeevskaya E.M., Khammami M.I., Gnennaya N.V., Al-Rammahi A.A.K., Rakin A.V., Sazykina M.A. (2019) Occurrence of antibiotic resistance genes in sewages of Rostov-on-Don and lower Don River. *Theor. App. Ecol.* **4**, 76–82. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-076-082>

51. Imlay J.A. (2015) Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr. Opin. Microbiol.* **24**, 124–31. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.004>
52. Li D., Zeng S., He M., Gu A.Z. (2016) Water disinfection byproducts induce antibiotic resistance-role of environmental pollutants in resistance phenomena. *Environ. Sci. Technol.* **50**(6), 3193–3201. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05113>
53. Li M., He Y., Sun J., Li J., Bai J., Zhang C. (2019) Chronic exposure to an environmentally relevant triclosan concentration induces persistent triclosan resistance but reversible antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* **53**(6), 3277–3286. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06763>
54. Merchel P., Pereira B., Wang X., Tagkopoulos I. (2021) Biocide-induced emergence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **12**, 640923. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640923>
55. Waldron K.J., Robinson N.J. (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(1), 25–35. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2057>
56. Gullberg E., Albrecht L.M., Karlsson C., Sandegren L., Andersson D.I. (2014) Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio.* **5**(5), e01918–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01918-14>
57. Seiler C., Berendonk T.U. (2012) Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* **3**, 399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>
58. Zhu Y.G., Johnson T.A., Su J.Q., Qiao M., Guo G.X., Stedtfeld R.D., Hashsham S.A., Tiedje J.M. (2013) Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 3435–3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>
59. Zhao X., Wang J., Zhu L., Wang J. (2019) Field-based evidence for enrichment of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in manure-amended vegetable soils. *Sci. Total Environ.* **654**, 906–913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.446>
60. Lin H., Sun W., Zhang Z., Chapman S.J., Freitag T.E., Fu J., Zhang X., Ma J. (2016) Effects of manure and mineral fertilization strategies on soil antibiotic resistance gene levels and microbial community in a paddy-upland rotation system. *Environ. Pollut.* **211**, 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.007>
61. Li L.G., Xia Y., Zhang T. (2017) Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *ISME J.* **11**(3), 651–662. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.155>
62. Christgen B., Yang Y., Ahammad S.Z., Li B., Rodriguez D.C., Zhang T., Graham D.W. (2015) Metagenomics shows that low-energy anaerobic-aerobic treatment reactors reduce antibiotic resistance gene levels from domestic wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **49**(4), 2577–2584. <https://doi.org/10.1021/es505521w>
63. Gu M., Imlay J.A. (2011) The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Mol. Microbiol.* **79**(5), 1136–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07520.x>
64. Coba de la Peña T., Redondo F.J., Fillat M.F., Lucas M.M., Pueyo J.J. (2013) Flavodoxin overexpression confers tolerance to oxidative stress in beneficial soil bacteria and improves survival in the presence of the herbicides paraquat and atrazine. *J. Appl. Microbiol.* **115**(1), 236–246. <https://doi.org/10.1111/jam.12224>
65. Sazykin I., Naumova E., Azhogina T., Klimova M., Karchava S., Khmelevtsova L., Chernyshenko E., Litsevich A., Khammami M., Sazykina M. (2024) Glyphosate effect on biofilms formation, mutagenesis and stress response of *E. coli*. *J. Hazard. Mater.* **461**, 132574. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132574>
66. Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khmelevtsova L.E., Khammami M.I., Karchava Sh.K., Zhuravlev M.V., Kudrevskaya E.M. (2016) Expression of SOD and production of reactive oxygen species in *Acinetobacter calcoaceticus* caused by hydrocarbons oxidation. *Ann. Microbiol.* **66**(3), 1039–1045. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1188-9>
67. Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khmelevtsova L.E., Seliverstova E.Yu., Karchava Sh.K., Zhuravleva M.V. (2018) Antioxidant enzymes and reactive oxygen species level of the *Achromobacter xylosoxidans* bacteria during hydrocarbons biotransformation. *Arch. Microbiol.* **200**(7), 1057–1065. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1516-0>
68. Sazykin I., Makarenko M., Khmelevtsova L., Seliverstova E., Rakin A., Sazykina M. (2019) Cyclohexane, naphthalene, and diesel fuel increase oxidative stress, *CYP153*, *sodA*, and *recA* gene expression in *Rhodococcus erythropolis*. *Microbiologyopen.* **8**(9), e00855. <https://doi.org/10.1002/mbo3.855>
69. Kim J., Park W. (2014) Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**(16), 6933–6946. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5883-4>
70. Pérez-Pantoja D., Nikel P.I., Chavarría M., de Lorenzo V. (2013) Endogenous stress caused by faulty oxidation reactions fosters evolution of 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria. *PLoS Genet.* **9**(8), e1003764. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003764>
71. Azhogina T., Sazykina M., Konstantinova E., Khmelevtsova L., Minkina T., Antonenko E., Sushkova S., Khammami M., Mandzheva S., Sazykin I. (2023) Bio-accessible PAH influence on distribution of antibiotic resistance genes and soil toxicity of different types of land use. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **30**(5), 12695–12713. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23028-2>
72. Ning Q., Wang D., An J., Ding Q., Huang Z., Zou Y., Wu F., You J. (2022) Combined effects of nanosized

- polystyrene and erythromycin on bacterial growth and resistance mutations in *Escherichia coli*. *J. Hazard. Mater.* **422**, 126858.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126858>
73. Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **35**, 322–332.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
74. Jian Z., Zeng L., Xu T., Sun S., Yan S., Yang L., Huang Y., Jia J., Dou T. (2021) Antibiotic resistance genes in bacteria: occurrence, spread, and control. *J. Basic Microbiol.* **61**(12), 1049–1070.
<https://doi.org/10.1002/jobm.202100201>
75. Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. (2018) Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, e00088–17.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
76. Vandecraen J., Chandler M., Aertsen A., Houdt R.V. (2017) The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 709–730.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303661>
77. Shintani M., Sanchez Z.K., Kimbara K. (2015) Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front. Microbiol.* **6**, 242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
78. Mao D., Luo Y., Mathieu J., Wang Q., Feng L., Mu Q., Feng C., Alvarez P.J. (2014) Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation. *Environ. Sci. Technol.* **48**(1), 71–78.
<https://doi.org/10.1021/es404280v>
79. Jutkina J., Marathe N.P., Flach C.F., Larsson D.G.J. (2018) Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Sci. Total Environ.* **616–617**, 172–178.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.312>
80. Li Q., Chang W., Zhang H., Hu D., Wang X. (2019) The role of plasmids in the multiple antibiotic resistance transfer in ESBLs-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater treatment plants. *Front. Microbiol.* **10**, 633.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00633>
81. Che Y., Xia Y., Liu L., Li A.D., Yang Y., Zhang T. (2019) Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome.* **7**(1), 44.
<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0663-0>
82. Scanlan P.D. (2017) Bacteria-bacteriophage coevolution in the human gut: implications for microbial diversity and functionality. *Trends Microbiol.* **25**, 614–623.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.012>
83. Chen J., Quiles-Puchalt N., Chiang Y.N., Bacigalupe R., Fillol-Salom A., Chee M.S.J., Fitzgerald J.R., Penadés J.R. (2018) Genome hypermobility by lateral transduction. *Science.* **362**, 207–212.
<https://doi.org/10.1126/science.aat5867>
84. Davies M.R., Holden M.T., Coupland P., Chen J.H., Venturini C., Barnett T.C., Zakour N.L., Tse H., Dougan G., Yuen K.Y., Walker M.J. (2015) Emergence of scarlet fever *Streptococcus pyogenes* emm12 clones in Hong Kong is associated with toxin acquisition and multidrug resistance. *Nat. Genet.* **47**, 84–87.
<https://doi.org/10.1038/ng.3147>
85. Haaber J., Penadés J.R., Ingmer H. (2017) Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **25**, 893–905. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.3.323>
86. Shapiro O.H., Kushmaro A., Brenner A. (2010) Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater. *ISME J.* **4**(3), 327–336. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.118>
87. Colomer-Lluch M., Calero-Caceres W., Jebri S., Hmaied F., Muniesa M., Jofre J. (2014) Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ. Int.* **73**, 167–175.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003>
88. Calero-Caceres W., Muniesa M. (2016) Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Res.* **95**, 11–18.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006>
89. Thingstad T.F. (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* **45**(6), 1320–1328.
<https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1320>
90. Lang A.S., Westbye A.B., Beatty J.T. (2017) The distribution, evolution, and roles of gene transfer agents in prokaryotic genetic exchange. *Annu. Rev. Virol.* **4**, 87–104.
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041624>
91. Solioz M., Marrs B. (1977) The gene transfer agent of *Rhodopseudomonas capsulata*. Purification and characterization of its nucleic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **181**, 300–307.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90508-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90508-2)
92. Brown-Jaque M., Calero-Cáceres W., Muniesa M. (2015) Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid.* **79**, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.01.001>
93. Lang A.S., Zhaxybayeva O., Beatty J.T. (2012) Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 472–482.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2802>
94. Guy L., Nystedt B., Toft C., Zaremba-Niedzwiedzka K., Berglund E.C., Granberg F., Näslund K., Eriksson A.S., Andersson S.G. (2013) A gene transfer agent and a dynamic repertoire of secretion systems hold the keys to the explosive radiation of the emerging pathogen *Bartonella*. *PLoS Genet.* **9**, e1003393.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003393>

95. McDaniel L.D., Young E., Delaney J., Ruhnau F., Ritchie K.B., Paul J.H. (2010) High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science*. **330**, 50. <https://doi.org/10.1126/science.1192243>
96. Marrs B. (1974) Genetic recombination in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **71**, 971–973. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.3.971>
97. Bárdy P., Füzik T., Hrebík D., Plevka P. (2020) Structure and mechanism of DNA delivery of a gene transfer agent. *Nat. Commun.* **11**, 3034. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16669-9>
98. Mirajkar N.S., Gebhart C.J. (2014) Understanding the molecular epidemiology and global relationships of *Brachyspira hyodysenteriae* from swine herds in the United States: a multi-locus sequence typing approach. *PLoS One*. **9**, e107176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107176>
99. Christensen S., Serbus L.R. (2020) Gene transfer agents in symbiotic microbes. *Results Probl. Cell Differ.* **69**, 25–76. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51849-3_2
100. Baharoglu Z., Mazel D. (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**(6), 1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>
101. Napolitano R., Janel-Bintz R., Wagner J., Fuchs R.P. (2000) All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J.* **19**(22), 6259–6265. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.6259>
102. Pagès V., Fuchs R.P. (2003) Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass *in vivo*. *Science*. **300**(5623), 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1083964>
103. Baharoglu Z., Mazel D. (2011) *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**(5), 2438–2441. <https://doi.org/10.1128/AAC.01549-10>
104. Boles B.R., Singh P.K. (2008) Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**(34), 12503–12508. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801499105>
105. Chen X., Yin H., Li G., Wang W., Wong P.K., Zhao H., An T. (2019) Antibiotic-resistance gene transfer in antibiotic-resistance bacteria under different light irradiation: implications from oxidative stress and gene expression. *Water Res.* **149**, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.019>
106. Hocquet D., Llanes C., Thouverez M., Kulasekara H.D., Bertrand X., Plésiat P., Mazel D., Miller S.I. (2012) Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* **8** (6), e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002778>
107. Soucy S.M., Huang J., Gogarten J.P. (2015) Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
108. Schönknecht G., Chen W.H., Ternes C.M., Barber G.G., Shrestha R.P., Stanke, M., Bräutigam A., Baker B.J., Banfield J.F., Garavito R.M., Carr K., Wilkerson C., Rensing S.A., Gagneul D., Dickenson N.E., Oesterhelt C., Lercher M.J., Weber A.P. (2013) Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science*. **339**, 1207–1210. <https://doi.org/10.1126/science.1231707>
109. Lin M., Kussell E. (2019) Inferring bacterial recombination rates from large-scale sequencing datasets. *Nat. Methods*. **16**, 199–204. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0293-7>
110. Niehus R., Mitri S., Fletcher A.G., Foster K.R. (2015) Migration and horizontal gene transfer divide microbial genomes into multiple niches. *Nat. Commun.* **6**, 8924. <https://doi.org/10.1038/ncomms9924>
111. Power J.J., Pinheiro F., Pompei S., Kovacova V., Yüksel M., Rathmann I., Förster M., Lässig M., Mairer B. (2021) Adaptive evolution of hybrid bacteria by horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **118**, e2007873118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007873118>
112. Chiang S.M., Schellhorn H.E. (2012) Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **525**(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.007>
113. Moore J.M., Correa R., Rosenberg S.M., Hastings P.J. (2017) Persistent damaged bases in DNA allow mutagenic break repair in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **13**(7), e1006733. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006733>
114. Pribis J.P., García-Villada L., Zhai Y., Lewin-Epstein O., Wang A.Z., Liu J., Xia J., Mei Q., Fitzgerald D.M., Bos J., Austin R.H., Herman C., Bates D., Hadany L., Hastings P.J., Rosenberg S.M. (2019) Gamblers: an antibiotic-induced evolvable cell subpopulation differentiated by reactive-oxygen-induced general stress response. *Mol. Cell.* **74**(4), 785–800.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.037>
115. Bos J., Zhang Q., Vyawahare S., Rogers E., Rosenberg S.M., Austin R.H. (2015) Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**(1), 178–183. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420702111>
116. Glaeser J., Zobawa M., Lottspeich F., Klug G. (2007) Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in *Rhodobacter*. *J. Proteome Res.* **6**, 2460–2471. <https://doi.org/10.1021/pr060624p>
117. Campbell E.A., Greenwell R., Anthony J.R., Wang S., Lim L., Das K., Sofia H.J., Donohue T.J., Darst S.A. (2007) A conserved structural module regulates tran-

- scriptional responses to diverse stress signals in bacteria. *Mol. Cell.* **27**, 793–805.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.009>
118. Nuss A.M., Glaeser J., Klug G. (2009) RpoHII activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **191**, 220–230.
<https://doi.org/10.1128/JB.00925-08>
119. Nuss A.M., Glaeser J., Berghoff B.A., Klug G. (2010) Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **192**, 2613–2623.
<https://doi.org/10.1128/JB.01605-09>
120. Adnan F., Weber L., Klug G. (2015) The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA Biol.* **12**, 569–577.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1031948>
121. Peng T., Berghoff B.A., Oh J.I., Weber L., Schirmer J., Schwarz J., Glaeser J., Klug G. (2016) Regulation of a polyamine transporter by the conserved 3' UTR-derived sRNA SorX confers resistance to singlet oxygen and organic hydroperoxides in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA Biol.* **13**, 988–999.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1212152>
122. Jitprasutwit S., Ong C., Juntawiang N., Ooi W.F., Hemsley C.M., Vattanaviboon P., Titball R.W., Tan P., Korbsrisate S. (2014) Transcriptional profiles of *Burkholderia pseudomallei* reveal the direct and indirect roles of Sigma E under oxidative stress conditions. *BMC Genomics.* **15**(1), 787.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-787>
123. Ahmed M.N., Porse A., Abdelsamad A., Sommer M., Høiby N., Ciofu O. (2019) lack of the major multifunctional catalase KatA in *Pseudomonas aeruginosa* accelerates evolution of antibiotic resistance in ciprofloxacin-treated biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**(10), e00766–19.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00766-19>
124. Tavita K., Mikkil K., Tark-Dame M., Jerabek H., Teras R., Sidorenko J., Tegova R., Tover A., Dame R.T., Kivisaar M. (2012) Homologous recombination is facilitated in starving populations of *Pseudomonas putida* by phenol stress and affected by chromosomal location of the recombination target. *Mutat. Res.* **737**(1–2), 12–24.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.07.004>
125. Akkaya Ö., Pérez-Pantoja D.R., Calles B., Nickel P.I., de Lorenzo V. (2018) The metabolic redox regime of *Pseudomonas putida* tunes its evolvability toward novel xenobiotic substrates. *MBio.* **9**(4), e01512–18.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01512-18>
126. Akkaya Ö., Nickel P.I., Pérez-Pantoja D., de Lorenzo V. (2019) Evolving metabolism of 2,4-dinitrotoluene triggers SOS-independent diversification of host cells. *Environ. Microbiol.* **21**(1), 314–326.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14459>

Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Microbial Communities: the Impact of Anthropogenic Pollution

I. S. Sazykin¹, M. A. Sazykina^{1, *}, A. R. Litsevich¹

¹Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344006 Russia

*e-mail: samara@sfedu.ru

The review considers issues related to the spread of antibiotic resistance genes in environmental microbial communities. “Hotspots” of adaptive evolution, accumulation and spread of antibiotic-resistant bacteria and genetic material of antibiotic resistance are highlighted. Such “hotspots” include anthropogenic ecosystems, such as municipal wastewater treatment plants, municipal solid waste landfills, livestock enterprises, and agroecosystems. The influence of various types of pollutants and biotic factors on enhancement of mutagenesis and horizontal transfer of antibiotic resistance genes is considered. The role of mobile genetic elements in mobilization and accelerated spread of resistance determinants is shown. Special attention is paid to the role of oxidative stress and stress regulons, which are activated for realization and control of molecular genetic mechanisms of adaptive evolution of bacteria and horizontal distribution of genetic material in bacterial populations. Oxidative stress is identified as one of the main activators of genome destabilization and adaptive evolution of bacteria.

Keywords: bacteria, antibiotic resistance genes, horizontal gene transfer, mutagenesis, pollutants, xenobiotics, oxidative stress

ПОЛУЧЕНИЕ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

УДК 615.015.35; 615.015.38

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ
ПАРЫ ИНКАПСУЛИРОВАННАЯ *Citrobacter freundii* C115H
МЕТИОНИН- γ -ЛИАЗА/МЕТИИН

© 2024 г. С. В. Ревтович^{a, *}, В. В. Куликова^a, В. С. Коваль^a, А. Д. Лыфенко^a,
В. А. Казаков^b, А. С. Чернов^b, Г. Б. Телегин^b, А. С. Земская^a,
Н. В. Ануфриева^a, Е. А. Морозова^a, П. Н. Сольев^a

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^bФилиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино,
Московская область, 142290 Россия

*e-mail: svetla21@mail.ru

Поступила в редакцию 12.04.2024 г.

После доработки 29.05.2024 г.

Принята к публикации 31.05.2024 г.

Исследованы острая и субхроническая токсичность фармакологической пары инкапсулированный фермент *Citrobacter freundii* C115H метионин- γ -лиаза/пролекарство (метиин) на самках мышей стока ICR. Препарат показал слабый/умеренный дозозависимый гепатотоксический эффект; большинство изменений морфологии печени относились к несущественным или слабовыраженным отклонениям от нормы. Длительное применение однократной терапевтической дозы 1.5 Ед *C. freundii* C115H метионин- γ -лиаза @ (PEG-P(Asp)₇₀/PLL₇₀)-PIC-сом/2 мг метиин на мышью приводило к незначительному снижению веса животных без явных признаков интоксикации; морфология печени у четверти животных не имела отклонений от нормы. Не обнаружено нефротоксического эффекта во всех использованных в исследовании группах.

Ключевые слова: метионин- γ -лиаза, метиин, фармакологическая пара, пролекарство, острая токсичность, субхроническая токсичность

DOI: 10.31857/S0026898424060064, **EDN:** HMWQWG

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность создания новых противомикробных средств обусловлена разнообразием биологических форм возбудителей, постоянным появлением штаммов, резистентных к уже известным антибиотикам, а также обнаружением новых видов опасных патогенов. Ранее нами было разработано оригинальное противомикробное средство – фармакологическая пара, обеспечивающая образование действующего вещества-антибиотика *in situ*, на основе применения оптимизированного ферментного препарата и проантибиотика [1]. Показано, что мутантная форма C115H метионин- γ -лиазы (МГЛ) из *Citrobacter freundii* способна эффективно катализировать расщепление сульфоксидов (\pm)S-алк(ен)ил-L-цистеина с образованием тиосульфидов, ингибирующих рост широкого спектра микроорганизмов [2–8], включая мультирезистентные штаммы [9]. С целью практичес-

кого применения предложено создать пролекарство на основе инкапсулирования фермента в полиионные везикулы (PIC-сомы), которые значительно увеличивают его стабильность в плазме крови лабораторных животных [10, 11]. В организме такой инкапсулированный фермент в течение длительного времени способен образовывать из фармакологически инертных сульфоксидов активные противомикробные агенты. Антибактериальное действие фармакологической пары инкапсулированная *C. freundii* C115H МГЛ/метиин, вырабатывающей наиболее перспективное в отношении *Pseudomonas aeruginosa* вещество, диметилтиосульфидат (рис. 1) [9], проверено на модели острой генерализованной инфекции в испытаниях *in vivo*, где показало высокую эффективность [12]. При этом как сама фармакологическая пара, так и ее отдельные компоненты оказывали низкое токсическое воздействие (или не оказывали вовсе)

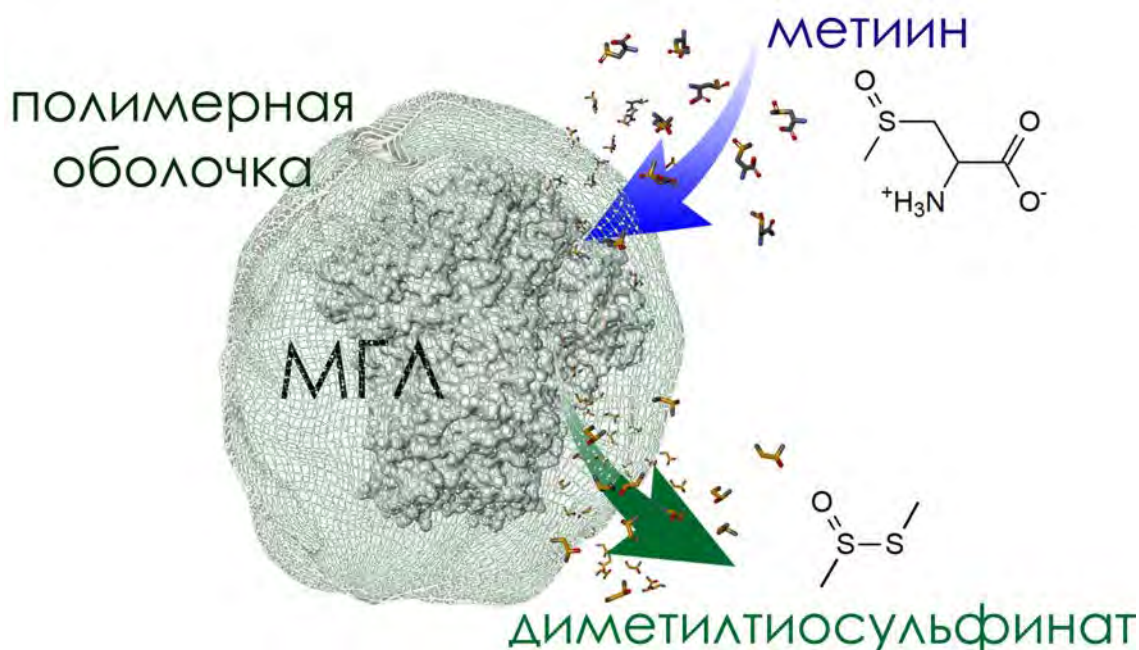


Рис. 1. Принцип действия фармакологической пары инкапсулированная МГЛ/метиин.

на способность ранних эмбрионов мышей проходить все стадии доимплантационного развития в условиях *in vitro* [13]. Тем не менее, прежде чем использовать полученные препараты в медицинской практике, необходимо оценить их безопасность на лабораторных животных [14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ), лактатдегидрогеназа из мышцы кролика, NADH ("Sigma", США); тиогликолевая среда, триптозосоевый бульон ("Merck", США); D,L-дитиотреитол, EDTA, протамина сульфат ("Serva", США); лактоза ("Panreac", Испания); глюкоза, глицерин, сульфат магния, сульфат аммония, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный ("Реахим", Россия); канамицин ("Панэко", Россия); дрожжевой экстракт, триптон ("Difco", США); DEAE-сефароза ("GE Healthcare", Швеция); АХД-2000 ("Lysoform", Германия); набор для количественного анализа хромогенных эндотоксинов *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL-reagent) ("Thermo Fisher Scientific", США); Endotoxin Extractor ("Sileks", Россия). Метиин синтезировали согласно [1]; 2-нитро-5-тиобензойную кислоту получали согласно [15]; полиэтиленгликоль-поли(L-аспарагиновую кислоту)₇₀ (ПЭГ-Р(Asp)₇₀) и поли(L-лизин)₇₀ (PLL₇₀) – согласно [16].

Выделение и очистка *C. freundii* C115H МГЛ. Рекомбинантную *C. freundii* C115H МГЛ выделя-

ли и очищали согласно [1]. Гомогенность препарата подтверждали методом ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли [17]. Концентрацию фермента определяли, используя коэффициент молярного поглощения $A_{1\%}^{278} = 0.8$ [18]. Эндотоксины удаляли согласно [12]. Содержание эндотоксинов в полученном препарате, определенное при помощи LAL-теста, составило 0.065 ЕЭ/мг.

Инкапсулирование *C. freundii* C115H МГЛ в полимерные везикулы. Инкапсулирование фермента проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (КФБ) pH 7.5 при температуре 37°C. Растворы 1 мг/мл ПЭГ-Р(Asp)₇₀ и PLL₇₀ (1 мг/мл) пропускали через мембранный фильтр 0.22 мкм, смешивали в эквивалентном соотношении звеньев полимеров -COO- и -NH₃⁺ и интенсивно перемешивали на вибрационном смесителе типа Vortex при скорости 2000 об/мин в течение 2 мин, затем добавляли раствор фермента C115H МГЛ (6 мг/мл в 10 мМ КФБ pH 7.5, 0.1 мМ ПЛФ) и перемешивали при той же скорости в течение еще 2 мин. Полученные полимерные везикулы, содержащие C115H МГЛ (C115H МГЛ-РiC-сом), очищали от неинкапсулированного фермента центрифугированием при 12000 об/мин. Затем промывали 4 раза буферным раствором (10 мМ КФБ pH 7.5, 0.1 мМ ПЛФ) до полного исчезновения пика 420 нм в супернатанте. Формирование нанокапсул подтверждено с помощью сканирующей электронной [16] и ядерно-силовой микроскопии [13]. Размер нанокапсул оценивали методом динамического рассеяния света

с помощью ZetaPALS (“Brookhaven Instruments Corp.”, США) при 25°C. Средний гидродинамический диаметр составил 52 ± 0.33 нм, z-потенциал – 3.45 ± 0.36 мВ. Для определения степени включения С115Н МГЛ в РІС-сомы фермент модифицировали родамином. Образцы анализировали при помощи флуориметра (“Varian”) при длине волны возбуждения 552 нм и длине волны эмиссии 575 нм. Степень включения фермента составила 10%.

Определение активности фермента. Активность МГЛ определяли в реакции β-элиминирования, измеряя скорость образования пирувата в сопряженной реакции с лактатдегидрогеназой по снижению поглощения NADH при 340 нм ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и 37°C. Реакционную смесь содержала рабочий буфер, 0.2 мМ NADH, 10 Ед лактатдегидрогеназы и 30 мМ S-метил-L-цистеин. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ/мин пирувата.

Лабораторные животные. В работе использовали самок аутбредных мышей ICR возрастом 8–10 недель, содержащихся в контролируемых условиях (температура, влажность, освещение) в НПП “Питомник лабораторных животных” ФИБХ РАН (УНУ “Био-модель” ИБХ РАН; Биоресурсная коллекция “Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований” ИБХ РАН, № 075-15-2021-1067) в клетках изоляторного типа IsoCage (“Techniplast”, Италия) социальными группами по три–пять особей. Исследование токсичности проводили в соответствии с руководящими принципами токсикологических исследований Организации экономического сотрудничества и развития (ОЕСД) для тестирования химикатов [19]. В опытах использовали самок мышей, поскольку самки более чувствительны к токсическим воздействиям, чем самцы [20].

Манипуляции с животными (инъекции препаратов, взвешивание, клинический осмотр, забор биоматериала и пр.) проводили в асептических условиях с использованием биозащищенного бокса с ламинарным потоком воздуха (2-й класс биозащиты). Эвтаназию животных выполняли в соответствии с международными требованиями [21] с помощью автоматизированного CO₂-бокса “Bioscare”. Все эксперименты и манипуляции одобрены институтской комиссией по уходу за лабораторными животными и их использованию (IACUC № 709/19 от 01.07.2019).

Контроль стерильности препаратов. Стерильность вводимых животным препаратов проверяли с использованием тест-систем: тиогликолевой среды и трипозосоевого бульона. Смывы

со всех пробирок, в которых содержались препараты, переносили во флакон с трипозосоевым бульоном и во флакон с тиогликолевой средой (по 1 мл в каждый). Флаконы инкубировали при 37°C в течение 48 ч, после чего проводили визуальный анализ изменения окраски сред и степени их мутности.

Острая и субхроническая токсичность. Подопытных животных распределяли в случайном порядке на пять групп. Группы исследования острой токсичности (группы 1–3, по шесть мышей в каждой) получали однократно дозу препаратов в первый день эксперимента. Животным группы 1 вводили инкапсулированную С115Н МГЛ (1.5 Ед/мышь) и метиин 2 мг/мышь ($\times 1$ терапевтическая доза [12]), мышам группы 2 вводили по 1.5 Ед инкапсулированной С115Н МГЛ и 10 мг метиина ($\times 5$ терапевтическая доза), группе 3 вводили инкапсулированную С115Н МГЛ 1.5 Ед/мышь и метиин 20 мг/мышь ($\times 10$ терапевтическая доза). Спустя 7 дней животных подвергали эвтаназии, выделяли почки и печень, проводили гистологическое исследование. Животным группы оценки субхронической токсичности (группа 4; восемь мышей) инкапсулированную С115Н МГЛ 1.5 Ед/мышь и метиин 2 мг/мышь вводили ежедневно с 1 по 7 день исследования. Через 7 дней после отмены препаратов животных подвергали эвтаназии, выделяли почки и печень и проводили гистологическое исследование. Контрольная группа животных (группа 5) получала 0.9%-ный раствор NaCl. Две мыши контрольной группы получали препарат согласно протоколу для групп исследования острой токсичности, три – согласно протоколу для группы субхронической токсичности.

Препараты вводили через хвостовую вену одноразовым шприцем с диаметром иглы 29G – сначала 100 мкл инкапсулированной С115Н МГЛ в буферном растворе (50 мМ КФБ, 0.1 мМ ПЛФ рН 7.5), затем 100 мкл метиина в физиологическом растворе. Промежуток времени между инъекциями фермента и метиина не превышал 15 мин. Перед введением препаратов область инъекции обрабатывали кожным антисептиком АХД-2000. На протяжении всего эксперимента проводили ежедневный клинический осмотр животных. Взвешивание выполняли на 1, 7 и 14 сутки эксперимента.

Гистологические исследования. Образцы биоматериала (печень и почки) фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, далее промывали в проточной воде, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, изучали с помощью световой микроскопии на

микроскопе AxioScore.A1 (“Carl Zeiss”, Германия). Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью камеры высокого разрешения AxioCam 305 color (“Carl Zeiss”). Степень выраженности морфологических отклонений оценивали с использованием следующей шкалы [22]: несущественное повреждение или отклонение от нормы (M1) – 1 балл, слабовыраженное повреждение или отклонение от нормы (SL) – 2 балла, умеренное повреждение или отклонение от нормы (MO) – 3 балла, выраженное повреждение или отклонение от нормы (MA) – 4 балла, резко выраженное повреждение или отклонение от нормы (SE) – 5 баллов (табл. S1, S2, см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Revtovich_rus.pdf).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Терапия пролекарствами обычно имеет ряд преимуществ перед традиционными препаратами благодаря более плавному повышению концентрации активных действующих веществ и их пролонгированному действию, что, в свою очередь, позволяет снизить частоту приема препарата и уменьшить токсическую нагрузку. Одним из кандидатов в противомикробные препараты, действующих на широкий спектр патогенов, является двухкомпонентная система, состоящая из инкапсулированной *C. freundii* C115H МГЛ и пролекарства-метиина. Замена Cys115 на гистидин в активном центре фермента повышает его каталитическую активность в реакции β-элиминирования S-замещенных сульфоксидов L-цистеина на порядок по сравнению с МГЛ ди-

кого типа. В ходе ферментативной реакции МГЛ с метином образуется наиболее стабильный из природных тиосульфидов диметилтиосульфидат [1, 6], основной противомикробный компонент растений рода *Brassica* [23]. Доклинические исследования токсичности на лабораторных мышцах при однократной и многократной инфузии фармакологической пары с оценкой патофизиологических изменений позволяют оценить безопасность терапии фармакологической парой на основе инкапсулированной *C. freundii* C115H МГЛ/метиина.

Ежедневные осмотры показали, что поведение, внешний вид и изменение веса подопытных мышей в группах исследования острой токсичности не отличались от показателей у мышей контрольной группы и соответствовали здоровым животным. Животные группы субхронической токсичности на момент окончания эксперимента потеряли около 14% начальной массы (табл. 1), не имели явных признаков интоксикации, однако были менее активными, а их шерстный покров был более взъерошенным по сравнению с контрольной группой. Определение массы почек и печени не выявило существенных различий в весе внутренних органов у животных всех групп (табл. 1).

Острая токсичность. Печень. У мышей контрольной группы на 7-й день после однократного введения физраствора в паренхиме печени находили единичные мелкие очаги мононуклеарной инфильтрации (рис. 2а). В одном случае отмечали очаговую гипертрофию гепатоцитов (рис. 2б). В группе введения однократной дозы препарата практически у всех животных в печеночной паренхиме обнаруживали многочислен-

Таблица 1. Изменение веса тела, массы почек и печени подопытных животных

Препарат (доза)	Физраствор	1.5 Ед C115H-РІС-сом МГЛ / 2 мг метиина (×1)	1.5 Ед C115H-РІС-сом МГЛ / 10 мг метиина (×5)	1.5 Ед C115H-РІС-сом МГЛ / 20 мг метиина (×10)	1.5 Ед C115H-РІС-сом МГЛ / 2 мг метиина (×1)
Число животных	5	6	6	6	8
<i>Изменение массы тела, г</i>					
1 день	32.40 ± 1.28	31.17 ± 1.22	32.67 ± 1.44	33.17 ± 0.89	32.63 ± 1.03
7 день	31.40 ± 1.52	30.67 ± 1.67	33.00 ± 2.00	30.00 ± 1.33	29.38 ± 1.72
14 день	30.33 ± 0.89*	–	–	–	28.13 ± 1.41
<i>Масса внутренних органов, г</i>					
Печень	1.51 ± 0.17	1.53 ± 0.12	1.59 ± 0.18	1.35 ± 0.06	1.53 ± 0.17
Почки	0.37 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.43 ± 0.05	0.39 ± 0.01	0.41 ± 0.03

*Число мышей в группе, $n = 3$.

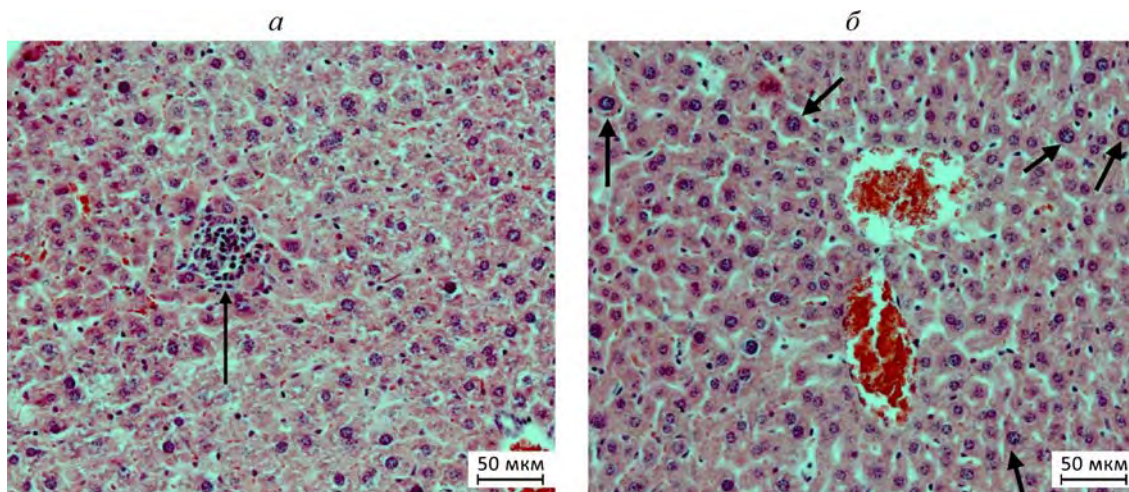


Рис. 2. Фрагменты печени самок мышей контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Стрелками указаны: *a* – мелкий очаг мононуклеарной инфильтрации в паренхиме одной из долей органа (мышь 5.1); *б* – гипертрофия отдельных гепатоцитов (мышь 5.2).

ные мелкие очаги мононуклеарной инфильтрации на месте погибших гепатоцитов с поздними проявлениями их фагоцитоза (рис. 3*a*) (табл. 2). У двух мышей данной группы отмечали очаговую гипертрофию гепатоцитов, у одной – единичные случаи кариомегалии гепатоцитов (рис. 3*б*). В группе введения пятикратной дозы препарата у двух животных в печеночной паренхиме находили также немногочисленные очаги нейтрофильной инфильтрации (рис. 4*a*), еще в двух случаях в очагах мононуклеарной инфильтра-

ции присутствовали сегментоядерные лейкоциты (рис. 4*б*). В группе введения 10-кратной дозы препарата в печени встречали те же изменения, что и при введении тестируемого вещества в дозировке $\times 5$. Вместе с тем, у двух животных данной группы в печени находили мелкие свежие очаги гепатоцитов с начальными явлениями некроза (рис. 5*a*). Еще у одной мыши в одной из долей органа наблюдали единичные гепатоциты с пигментными включениями в цитоплазме (рис. 5*б*).

Таблица 2. Изменение морфологии печени и почек экспериментальных животных

Препарат (доза)	Физраствор	1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ / 2 мг метиина ($\times 1$)	1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ / 10 мг метиина ($\times 5$)	1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ / 20 мг метиина ($\times 10$)	Физраствор	1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ / 2 мг метиина ($\times 1$)
Число животных	2	6	6	6	3	8
Период введения препарата, дни	1		7			
Некропсия, день	7		14			
Число образцов	2	6	6	6	3	8
Характер изменений в органах	Количество и степень выраженности изменений					

Печень:

Окончание таблицы 2

Препарат (доза)	Физраствор	1.5 Ед С115Н- PIC-сом МГЛ / 2 мг метиина (×1)	1.5 Ед С115Н- PIC- сом МГЛ / 10 мг метиина (×5)	1.5 Ед С115Н- PIC- сом МГЛ / 20 мг метиина (×10)	Физраствор	1.5 Ед С115Н- PIC- сом МГЛ / 2 мг метиина (×1)
Число образцов с изменением морфологии	2	6	6	6	2	6
Очаговая гипертрофия гепатоцитов	1MI	2MI	2MI 1SL	2MI	0	3MI 1SL
Кариомегалия гепатоцитов	0	1MI	1MI	3MI	0	1MI
Мононуклеарные инфильтраты в печеночной паренхиме	2MI	1MI 5SL	5MI 1SL	2MI 3SL	1MI 1SL	3MI 1SL
Фагоцитоз погибших гепатоцитов в очагах мононуклеарной инфильтрации	0	5SL	1SL	2SL	1SL	0
Очаги инфильтрации печеночной паренхимы сегментоядерными лейкоцитами	0	0	2MI 2SL	2MI	1SL	1MI
Свежие мелкие очаги некроза гепатоцитов	0	0	0	2MI	0	1SL
Пигментные включения в цитоплазме гепатоцитов	0	0	0	1MI	0	1MI
Очаги экстрамедуллярного гемопоэза	0	0	0	0	0	1SL
СУММАРНЫЙ БАЛЛ	3	24	20	22	7	17

Почки:

Число образцов с изменением морфологии	0	2	2	0	0	0
Явления хронической прогрессирующей нефропатии	0	2MI	2MI	1MI	0	0
Тубулярные кисты в корковом веществе, выстланные кубическим или уплощенным эпителием	0	1SL	0	0	0	0
Мелкий периваскулярный очаг мононуклеарной инфильтрации	0	0	0	1MI	0	0
СУММАРНЫЙ БАЛЛ	0	4	2	2	0	0

Примечание. MI (несущественное повреждение или отклонение от нормы) – 1 балл, SL (слабовыраженное повреждение или отклонение от нормы) – 2 балла, MO (умеренное повреждение или отклонение от нормы) – 3 балла, MA (выраженное повреждение или отклонение от нормы) – 4 балла, SE (резко выраженное повреждение или отклонение от нормы) – 5 баллов.

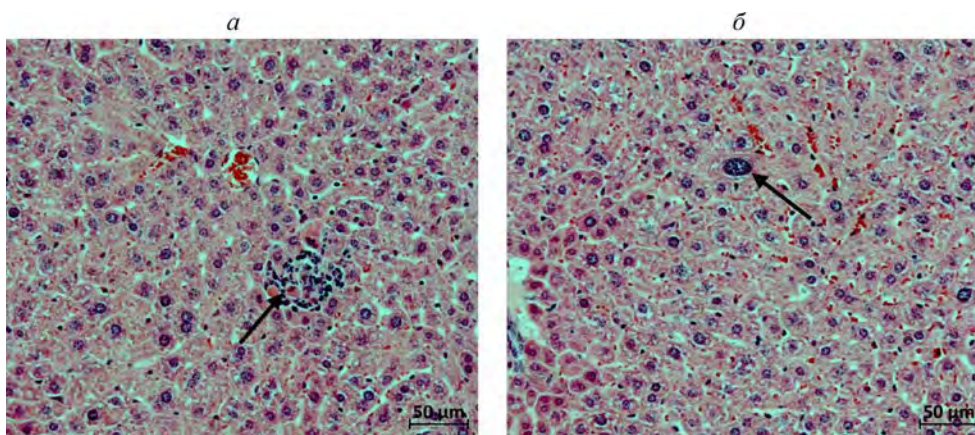


Рис. 3. Фрагменты печени самок мышей на 7-й день после однократного введения 1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/2 мг метиина. Окраска гематоксилином и эозином. Стрелками указаны: *a* – мелкий очаг мононуклеарной инфильтрации в паренхиме одной из долей органа (мышь 1.2); *б* – кариомегалия гепатоцита (мышь 1.3).

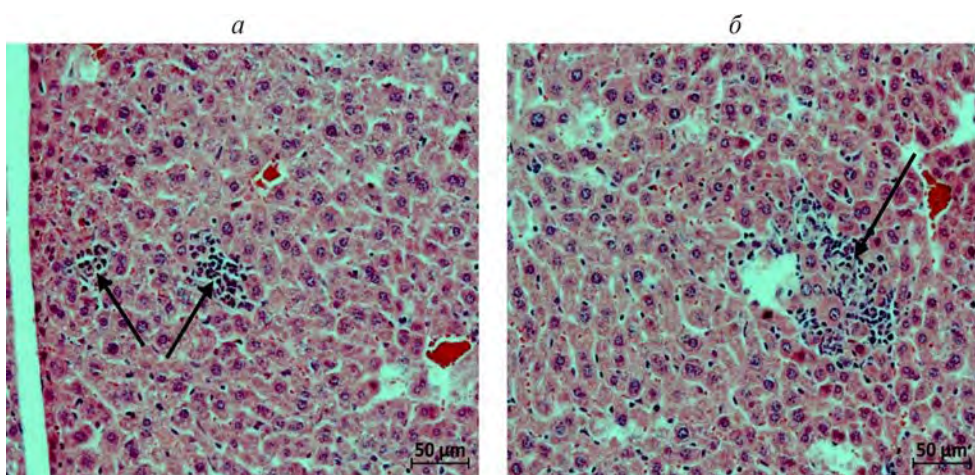


Рис. 4. Фрагменты печени самок мышей на 7-й день после однократного введения 1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ / 10 мг метиина. Окраска гематоксилином и эозином. Стрелками указаны: *a* – мелкие очаги инфильтрации сегментоядерными лейкоцитами (мышь 2.1), *б* – очаг мононуклеарной инфильтрации с единичными сегментоядерными лейкоцитами и явлениями фагоцитоза погибших гепатоцитов (мышь 2.6).

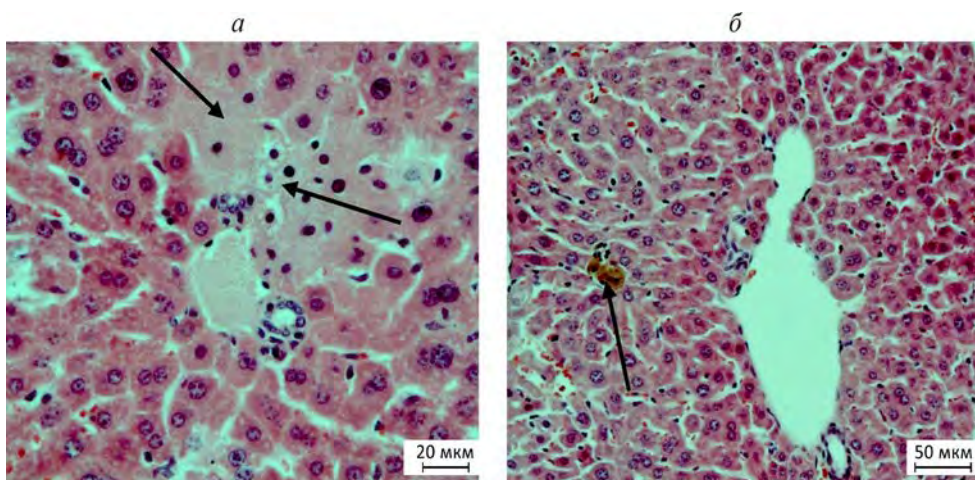


Рис. 5. Фрагменты печени самок мышей на 7-й день после однократного введения 1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/20 мг метиина. Окраска гематоксилином и эозином. Стрелками указаны: *a* – очаг гепатоцитов с начальными явлениями некроза (мышь 3.4), *б* – гепатоциты с пигментными включениями в цитоплазме (мышь 3.5).

Таким образом, проведенное гистологическое исследование выявило слабое/умеренное дозозависимое гепатотоксическое действие однократного введения тестируемого препарата, проявляющееся, прежде всего, в мелкоочаговой гибели гепатоцитов.

Острая токсичность. Почки. У мышей группы негативного контроля не выявлено каких-либо отклонений морфофункцио-

нального состояния почек от нормы (рис. 6). В группе однократного введения препарата (1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/2 мг метиина) в почках двух особей обнаружены начальные проявления хронической прогрессирующей нефропатии (рис. 7а). В одном из этих случаев в корковом веществе одной из почек присутствовали две тубулярные кисты, выстланные кубическим или уплощенным эпителием (рис. 7б). В группе тестирования

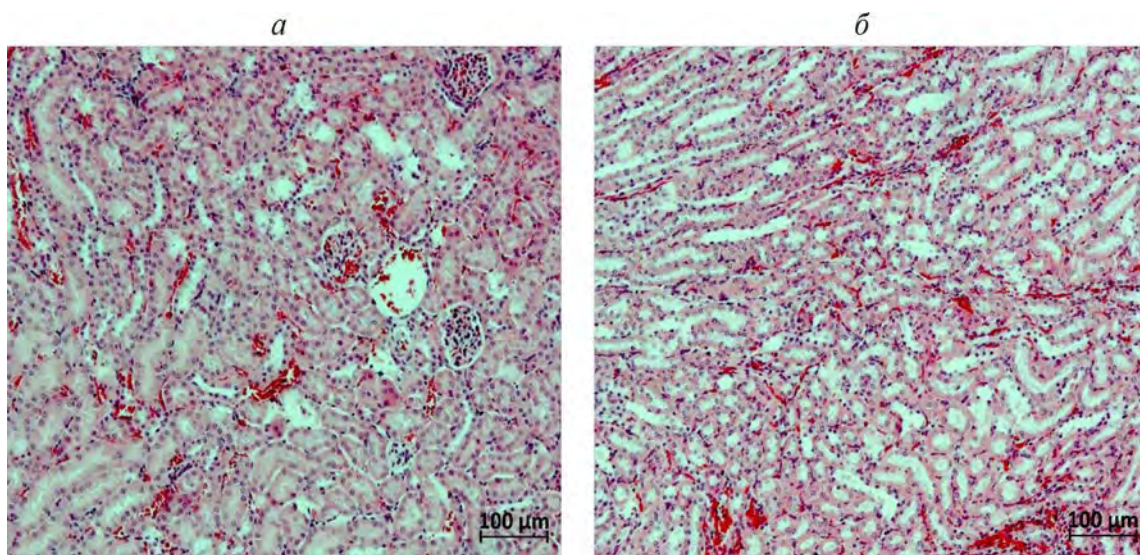


Рис. 6. Фрагменты коркового (а) и мозгового (б) вещества почки самки мыши контрольной группы (мышь 5.1). Обычное гистологическое строение органа. Окраска гематоксилином и эозином.

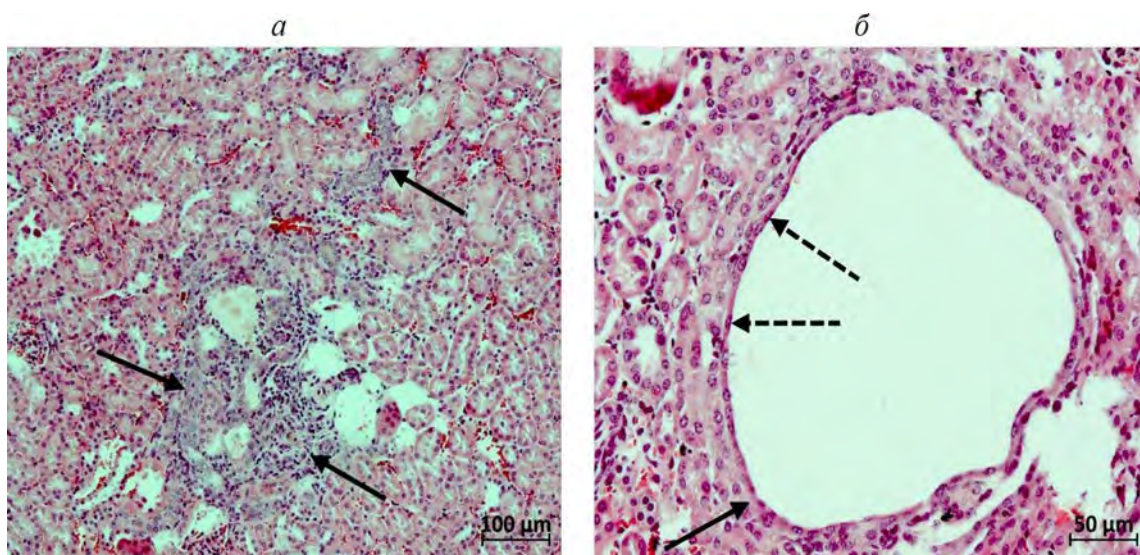


Рис. 7. Фрагменты коркового вещества почки самок мышей на 7-й день после однократного введения 1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/2 мг метиина. Окраска гематоксилином и эозином. Стрелками указаны: а – явления хронической прогрессирующей нефропатии (мышь 1.5), б – тубулярная киста (сплошная стрелка), выстланная уплощенным эпителием (пунктирные стрелки; мышь 1.3).

пятикратной терапевтической дозы (1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/10 мг метиина) в почках двух животных также найдены начальные проявления хронической прогрессирующей нефропатии. В группе введения 10-кратной дозы препарата только в одном случае в почках обнаружены начальные проявления хронической прогрессирующей нефропатии (рис. 8а), у той же мыши найден мелкий периваскулярный очаг мононуклеарной инфильтрации (рис. 8б).

трации (рис. 8б). В гистологических образцах почек остальных животных отклонений от нормы не наблюдали.

Таким образом, гистологическое исследование не привело к получению каких-либо убедительных данных о наличии нефротоксического действия тестируемого препарата в указанных дозах при однократном введении. Описанные единичные патоморфологические изменения

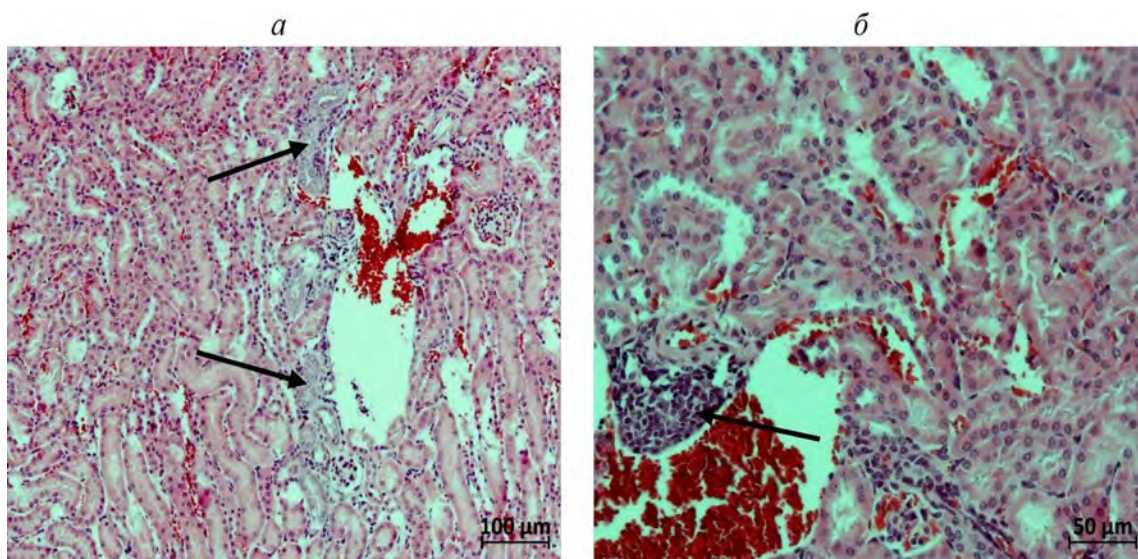


Рис. 8. Фрагменты коркового вещества почки мыши (мышь 3.5) на 7-й день после однократного введения 1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/20 мг метиина. Окраска гематоксилином и эозином. Стрелками указаны: явления хронической прогрессирующей нефропатии (а) и периваскулярный очаг мононуклеарной инфильтрации (б).

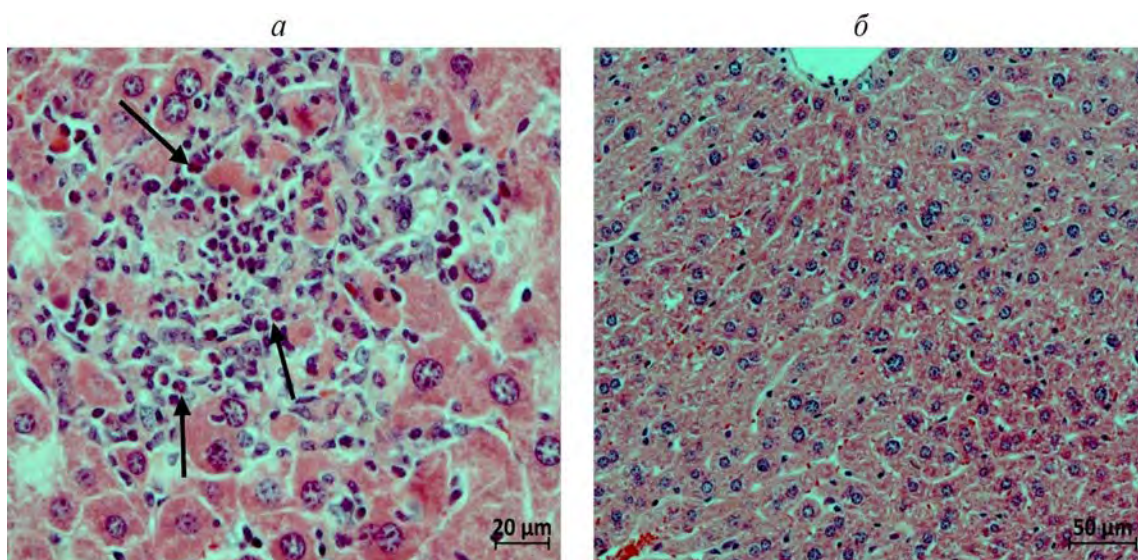


Рис. 9. Фрагменты печени самок мышей контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином. а – Стрелками указан очаг мононуклеарной инфильтрации с сегментоядерными лейкоцитами (мышь 5.4). б – Обычное гистологическое строение органа (мышь 5.3).

в почках являются фоновыми, не связанными с токсическим действием препарата.

Субхроническая токсичность. Печень. У двух животных контрольной группы ($n = 3$) в паренхиме разных долей печени обнаружены мелкие очаги мононуклеарной инфильтрации, в одном случае — с явлениями фагоцитоза погибших гепатоцитов и присутствием в части таких очагов сегментоядерных лейкоцитов (рис. 9а). Еще у одного животного не выявлено отклонений функциональной морфологии печени от нормы (рис. 9б). В группе определения субхронической токсичности через 7 дней после отмены препарата выявлены следующие отличия морфологиче-

ского состояния печени от контрольной группы: у четырех животных отмечена очаговая гипертрофия гепатоцитов — у одной самки наблюдались также единичные случаи кариомегалии гепатоцитов и свежие мелкие очаги некроза гепатоцитов в разных долях органа (рис. 10а); у одной мыши обнаружены единичные гепатоциты с пигментными включениями в цитоплазме (рис. 10б); еще в одном случае выявлены многочисленные мелкие очаги экстрамедуллярного гемопоэза в разных долях органа (рис. 10в). У двух животных не отмечено отклонений функциональной морфологии печени от нормы (рис. 10г). Тем не менее, возникновение свежих очагов некроза гепатоцитов у одной мыши спу-

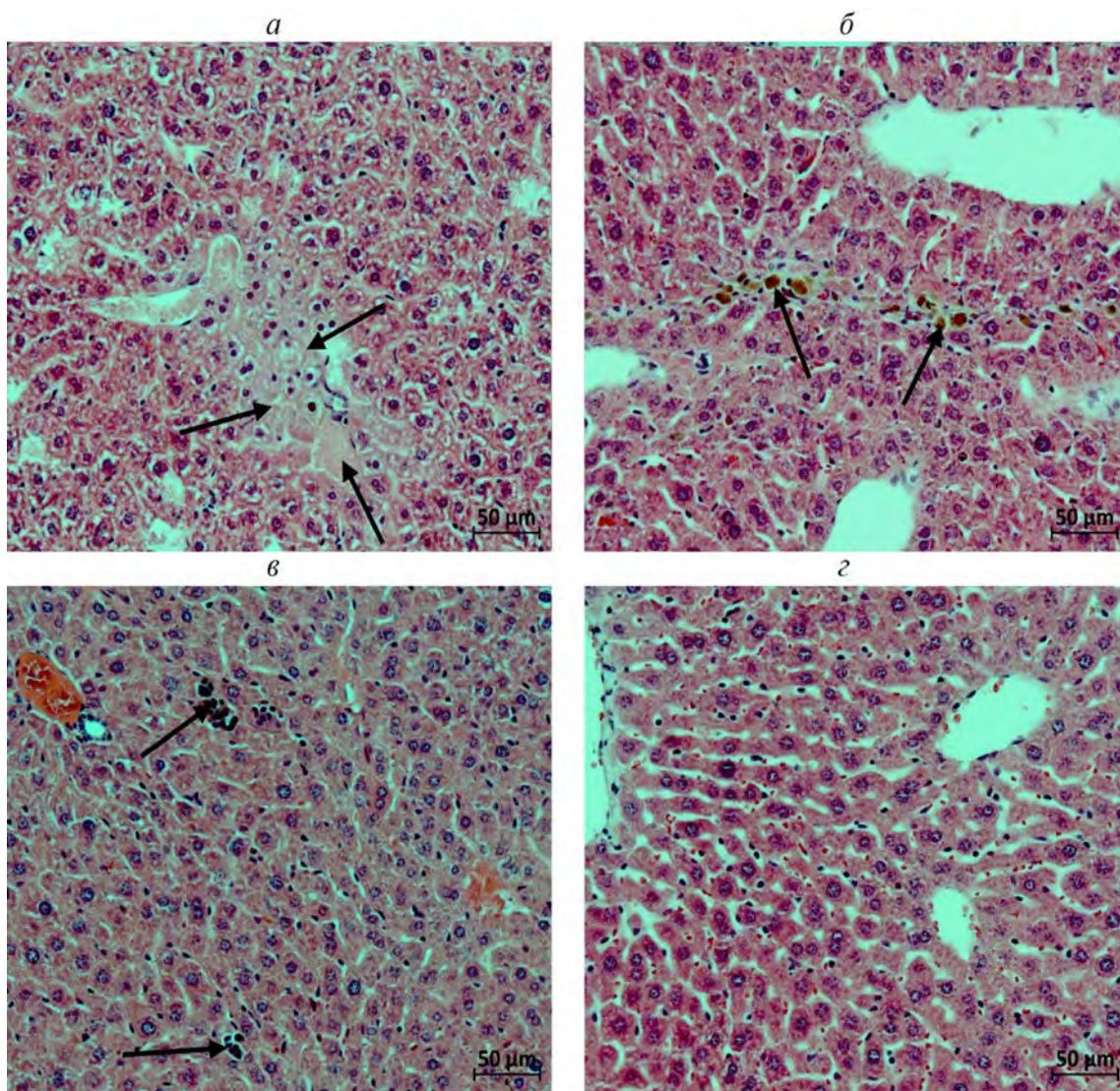


Рис. 10. Фрагменты печени самок мышей на 15-й день после 7-кратного введения 1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/2 мг метиина. Окраска гематоксилином и эозином. Стрелками указаны: а — очаг гепатоцитов с начальными явлениями некроза (мышь 4.1); б — гепатоциты с пигментными включениями в цитоплазме (мышь 4.3); в — мелкие очаги экстрамедуллярного гемопоэза (мышь 4.6); г — обычное гистологическое строение органа (мышь 4.7).

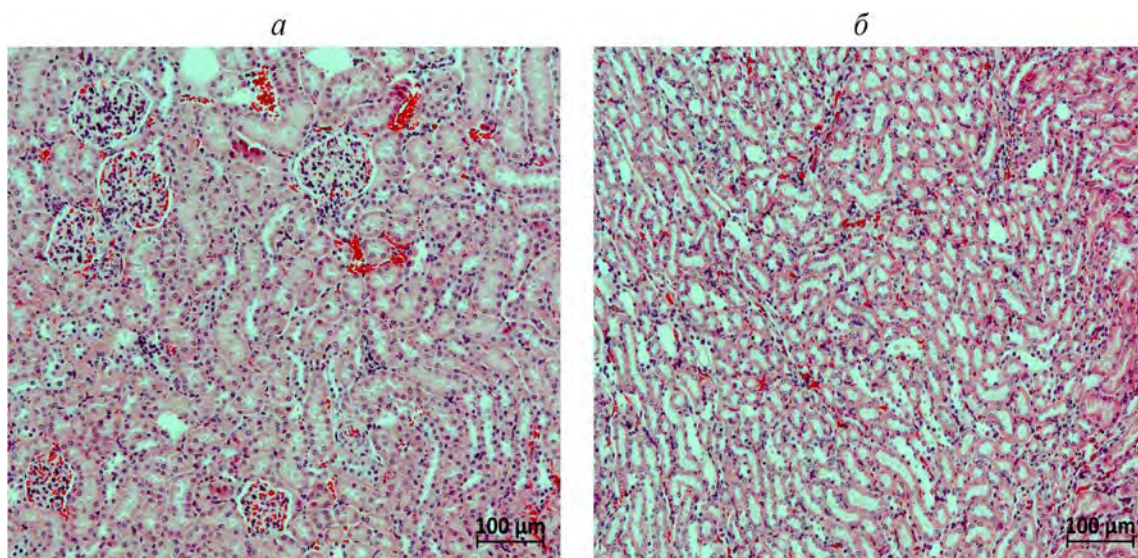


Рис. 11. Фрагменты коркового (а) и мозгового (б) вещества почки мыши на 15-й день после 7-кратного введения 1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/2 мг метиина (мышь 4.4). Обычное гистологическое строение органа. Окраска гематоксилином и эозином.

ся 7 дней после окончания введения препарата не позволяет исключить гепатотоксическое действие тестируемого препарата. Однако все остальные изменения функциональной морфологии печени можно отнести к единичным фоновым находкам.

Субхроническая токсичность. Почки. Гистологическое исследование почек животных группы субхронической токсичности и мышей контрольной группы не выявило в них каких-либо патоморфологических изменений (рис. 11). Таким образом, ежедневное введение 1.5 Ед С115Н-РІС-сом МГЛ/2 мг метиина ($\times 1$) в течение 7 дней не привело к гистологически заметным проявлениям нефротоксического действия препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменения морфологии печени во всех экспериментальных группах относились к несущественным или слабовыраженным повреждениям/отклонениям от нормы. Отмечено, что исследуемый препарат оказывает негативное дозозависимое влияние на печень: умеренное при однократном введении $\times 10$ терапевтической дозы (ранняя и отсроченная гибель клеток печени) и слабое при однократном введении $\times 5$ и $\times 1$ терапевтических доз (поздняя стадия фагоцитоза погибших гепатоцитов). Низкое гепатотоксическое действие наблюдалось и при ежедневном однократном введении терапевтической дозы в течение 7 дней; морфология печени у четверти животных группы субхронической токсичности не отличалась от нормы.

Нефротоксический эффект во всех группах исследования не был обнаружен. Таким образом, фармакологическая пара инкапсулированный фермент С115Н МГЛ/метиин не вызвала существенных отклонений от нормы при исследовании на мышинных моделях и может стать перспективным лекарственным препаратом, способным блокировать развитие патогенных бактерий в организме.

Исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 20-74-10121-П).

Проведение экспериментов и содержание животных на базе Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (филиал в г. Пушкино) соответствовали правилам Европейского Парламента и Совета Европейского Союза (Директива 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г.) и были одобрены комиссией Филиала института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных IACUC № 709/19 от 01.07.2019.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morozova E., Kulikova V., Rodionov A., Revtovich S., Anufrieva N., Demidkina T. (2016) Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produc-

- es antimicrobial thiosulfinates. *Biochimie*. **128–129**, 92–98.
2. Iciek M., Kwiecień I., Włodek L. (2009) Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environ. Mol. Mutagenesis*. **50**, 247–265.
 3. Jacob C. (2006) A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Nat. Prod. Rep.* **23**, 851–863.
 4. Kim S., Kubec R., Musah R.A. (2006) Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. *J. Ethnopharmacol.* **104**, 188–192.
 5. Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Revtovich S.V., Chernov A.S., Telegin G.B., Morozova E.A., Demidkina T.V. (2016) Mutant form C115H of *Clostridium sporogenes* methionine γ -lyase efficiently cleaves S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides to antibacterial thiosulfinates. *IUBMB Life*. **68**, 830–835.
 6. Leontiev R., Hohaus N., Jacob C., Gruhlke M.C.H., Slusarenko A.J. (2018) A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. *Sci. Rep.* **8**, 6763.
 7. Revtovich S., Lyfenko A., Tkachev Y., Kulikova V., Koval V., Puchkov V., Anufrieva N., Solyev P., Morozova E. (2023) Anticandidal activity of *in situ* methionine γ -lyase-based thiosulfinate generation system vs. synthetic thiosulfinates. *Pharmaceuticals* (Basel). **16**(12), 1695.
 8. Small L.D., Bailey J.H., Cavallito C.J. (1947) Alkyl thiosulfinates. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1710–1717.
 9. Куликова В.В., Чернуха М.Ю., Морозова Е.А., Ревтович С.В., Родионов А.Н., Коваль В.С., Аветисян Л.Р., Кулястова Д.Г., Шагинян И.А., Демидкина Т.В. (2018) Антибактериальное действие тиосульфидов на мультирезистентные штаммы бактерий, выделенные от больных муковисцидозом. *Acta Naturae*. **10**, 83–87.
 10. Anraku Y., Kishimura A., Kamiya M., Tanaka S., Nomoto T., Toh K., Matsumoto Y., Fukushima S., Sueyoshi D., Kano M.R., Urano Y., Nishiyama N., Kataoka K. (2016) Systemically injectable enzyme-loaded polyion complex vesicles as *in vivo* nanoreactors functioning in tumors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **55**, 560–565.
 11. Kulikova V.V., Morozova E.A., Anufrieva N.V., Koval V.S., Lyfenko A.D., Lesnova E.I., Kushch A.A., Revtovich S.V., Demidkina T.V. (2022) Kinetic and pharmacokinetic characteristics of therapeutic methionine γ -lyase encapsulated in polyion complex vesicles. *Biochimie*. **194**, 13–18.
 12. Morozova E., Kulikova V., Koval V., Anufrieva N., Chernukha M., Avetisyan L., Lebedeva L., Medvedeva O., Burmistrov E., Shaginyan I., Revtovich S., Demidkina T. (2020) Encapsulated methionine γ -lyase: application in enzyme prodrug therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *ACS Omega*. **5**, 7782–7786.
 13. Morozova E., Koval V., Revtovich S., Lyfenko A., Minakov A., Chernov A., Telegin G., Kirilenko D., Chobanian A., Anufrieva N., Kulikova V., Demidkina T. (2023) Phytoestrogens decorated nanocapsules for therapeutic methionine γ -lyase targeted delivery. *Biochimie*. **209**, 1–9.
 14. Миронов А.Н. (2012) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К.
 15. Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Weiner L., Wilchek M. (1998) A spectrophotometric assay for alliinase and alliinase (alliin lyase) activity: reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfinates. *Anal. Biochem.* **265**, 317–325.
 16. Koval V., Morozova E., Revtovich S., Lyfenko A., Chobanian A., Timofeeva V., Solovieva A., Anufrieva N., Kulikova V., Demidkina T. (2022) Characteristics and stability assessment of therapeutic methionine γ -lyase-loaded polyionic vesicles. *ACS Omega*. **7**, 959–967.
 17. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
 18. Морозова Е.А., Бажулина Н.П., Ануфриева Н.В., Мамаева Д.В., Ткачев Я.В., Стрельцов С.А., Тимофеев В.П., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В. (2010) Кинетические и спектральные параметры взаимодействия *Citrobacter freundii* метионин- γ -лиазы с аминокислотами. *Биохимия*. **75**, 1435–1445.
 19. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (2008) Guidelines for the Testing of Chemicals and Food Ingredients. Section 4 (Part 407). Paris, France.
 20. Mennecozzi M., Landesmann B., Palosaari T., Harris G., Whelan M. (2015) Sex differences in liver toxicity – do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants *in vitro*? *PLoS One*. **10**(4), e0122786.
 21. American Veterinary Medical Association (2020) AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. Schaumburg (IL), USA. ISBN978–1–882691–09–8
 22. Mann P.C., Vahle J., Keenan C.M., Baker J.F., Bradley A.E., Goodman D.G., Harada T., Herbert R., Kaufmann W., Kellner R., Nolte T., Rittinghausen S., Tanaka T. (2012) International harmonization of toxicologic pathology: nomenclature: an overview and review of basic principles. *Toxicol. Pathol.* **40**, 7S–13S.
 23. Kyung K.H., Fleming H.P. (1994) S-Methyl-L-cysteine sulfoxide as the precursor of methyl methanethiosulfinate, the principal antibacterial compound in cabbage. *J. Food Sci.* **59**, 350–355.

**Toxicity Study of Pharmacological Pair Encapsulated
Citrobacter freundii C115H Methionine γ -Lyase / Methiin**

**S. V. Revtovich^{1, *}, V. V. Kulikova¹, V. S. Koval¹, A. D. Lyfenko¹,
V. A. Kazakov², A. S. Chernov², G. B. Telegin², A. S. Zemskaya¹,
N. V. Anufrieva¹, E. A. Morozova¹, P. N. Solyev¹**

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

²*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

**e-mail: svetla21@mail.ru*

The acute and subchronic toxicity of the pharmacological pair based on encapsulated *Citrobacter freundii* C115H methionine γ -lyase enzyme/prodrug (methiin) was studied in female ICR mice. The drug showed a weak/moderate dose-dependent hepatotoxic effect. Most of the identified changes in liver morphology were insignificant or mild deviations from the norm. Long-term use of a single therapeutic dose per mouse of 1.5 U *C. freundii* C115H methionine γ -lyase @ (PEG–P(Asp)₇₀/PLL₇₀)-PICsome / 2 mg methiin led to a slight decrease in the weight of animals without obvious signs of intoxication. A quarter of the animals in this group had no deviations from the norm in liver morphology. No nephrotoxic effect in all study groups was found.

Keywords: methionine γ -lyase, methiin, pharmacological pair, prodrug, acute toxicity, subchronic toxicity

ПОЛУЧЕНИЕ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

УДК 577.181.7

СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОСУЛЬФИНАТОВ – АНАЛОГОВ АЛЛИЦИНА

© 2024 г. В. М. Пучков^а, А. Д. Лыфенко^а, В. С. Коваль^а,
С. В. Ревтович^а, В. В. Куликова^а, Н. В. Ануфриева^а,
А. С. Земская^а, Е. А. Морозова^{а, *}, П. Н. Сольев^а

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: elmorozova@yahoo.com

Поступила в редакцию 17.04.2024 г.

После доработки 13.06.2024 г.

Принята к публикации 18.06.2024 г.

Диаллилтиосульфидат (аллицин) эффективно подавляет рост различных микроорганизмов, в том числе штаммов, устойчивых к антибиотикам, поэтому его можно рассматривать как противомикробное соединение широкого спектра действия. Однако нестабильность аллицина в кровотоке препятствует его применению в качестве терапевтического средства. Нами синтезирован ряд аналогов аллицина, как природных, так и синтетических, и оценена *in vitro* их противомикробная активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Показано, что синтезированные соединения проявляют более выраженную противогрибковую активность, чем антибактериальную. Среди полученных соединений синтетический ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты эффективно подавлял рост как грибов, так и бактерий в концентрациях, сравнимых с известными противомикробными средствами, используемыми в медицинской практике.

Ключевые слова: аллицин, тиосульфидаты, противомикробная активность, полимикробная инфекция, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*

DOI: 10.31857/S0026898424060074, **EDN:** HMWIWS

ВВЕДЕНИЕ

Полимикробные инфекции, вызываемые сочетаниями бактерий, вирусов и грибов, все чаще усугубляют тяжесть течения заболеваний и ухудшают прогнозы выздоровления пациентов. Многие из этих полимикробных взаимодействий происходят внутри биопленок, которые образуются на естественных или искусственных поверхностях (имплантированных медицинских устройствах) и внутри организма человека [1] и ответственны за ~80% микробных инфекций у людей [2]. По сравнению с одновидовыми биопленками полимикробные часто обеспечивают специфические преимущества для каждого вида патогена [3]. Появление метициллинрезистентного золотистого стафилококка (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) и его способность к образованию биопленки стали серьезной проблемой здравоохранения

в последние десятилетия [4, 5]. В организме хозяина бактерии *S. aureus* сосуществуют с различными патогенами, включая дрожжеподобные грибы *Candida albicans* [6]. Бактерия *S. aureus* признана третьим по частоте видом, изолируемым совместно с *C. albicans* при многих заболеваниях, таких как пародонтит, стоматит, муковисцидоз, кератит, ассоциированная с искусственной вентиляцией легких пневмония, а также инфекции мочевыводящих путей и ожоговых ран [7]. Растущее использование имплантированных медицинских устройств – еще одна причина неуклонного роста частоты кандидозной и стафилококковой инфекций. Эти патогены эффективно формируют полимикробные биопленки на медицинских имплантатах [8]. Взаимодействие *S. aureus* и *C. albicans* сопровождается синергетическим эффектом в формировании биопленок и способствует возникновению антибиотикорезистентности у *S. aureus* [9].

Сокращения: МПК – минимальная подавляющая концентрация; MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) – метициллинрезистентный золотистый стафилококк.

Существующие противогрибковые и антибактериальные препараты в концентрациях, эффективных против планктонных клеток *C. albicans* и *S. aureus*, далеко не всегда “работают” против этих клеток в биопленках [10]. Увеличение терапевтических доз может иметь положительный эффект, но часто вызывает серьезные побочные эффекты (повреждение почек или печени), поэтому поиск новых противомикробных препаратов продолжает оставаться актуальной проблемой современной медицины.

Диаллилтиосульфид (алицин) образуется в растениях рода *Allium* в результате реакции β-элиминирования сульфоксида *S*-аллил-L-цистеина (алиина), катализируемой пиридоксаль-5'-фосфатзависимым ферментом алииназой (КФ 4.4.1.4), и обладает антимикробным действием, в том числе по отношению к MRSA [11, 12]. Противомикробный эффект алицина обусловлен его способностью быстро реагировать с серосодержащими белками клетки благодаря присутствию в его структуре тиосульфидной группы [13]. В отличие от большинства антибиотиков, применяемых в клинике, мишенью алицина в клетке не является конкретный белок, поэтому развитие резистентности к нему маловероятно. Диалкилтиосульфиды – аналоги алицина с насыщенной углеводородной боковой цепью (диметилтиосульфид, диэтилтиосульфид, дипропилтиосульфид) – более стабильны по сравнению с алицином [14] и проявляют аналогичный механизм антимикробного действия [15]. В связи с тем, что диалкилтиосульфиды проявляют как антибактериальную, так и противогрибковую активность [14, 16, 17], получение новых синтетических производных сульфидов и изучение их противомикробных свойств – важное направление в разработке средств для борьбы с полимикробными биопленками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Диметилдисульфид, диэтилдисульфид, дипропилдисульфид, трифторэтанол, трихлорэтанол, *мета*-хлорпербензойная кислота (*m*-СВРА, >77%) и H₂O₂ (30%-ный водный раствор) были приобретены у “Sigma-Aldrich” (США). Сульфат натрия, гидрокарбонат натрия, оксид фосфора, уксусная кислота, серная кислота, метанол, хлористый метилен, дитиодипропионовая кислота, *n*-гексан, этилацетат были приобретены в компании “РусХим” (Россия). Все вышеперечисленные реактивы имели чистоту не менее 98% и использованы в реакциях без дополнительной очистки. Среда RPMI-1640, 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS, > 99.5%) приобретены в компании “ПанЭко” (Россия). Агар и бульон Мюллера-Хинтон – производства

“HiMedia” (Индия); YPD-агар и вторичный фармацевтический стандарт флуконазола приобретены у “Sigma-Aldrich”; ванкомицин из *Amycolatopsis orientalis* – аптечный препарат (“Синтез”, Россия). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) выполняли на пластинках TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ (“Merck”, Германия).

Спектральный анализ. ¹H и ¹³C (с подавлением C–H взаимодействия) ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance III (“Bruker BioSpin GmbH”, Германия) с частотой 300 МГц для ¹H и 75.5 МГц для ¹³C ядер в ДМСО-*d*₆, если не указано иное. Химические сдвиги указаны относительно остаточного сигнала для ДМСО-*d*₆: δ 2.50 м.д. для ¹H ЯМР и 39.52 м.д. для ¹³C ЯМР – в качестве внутреннего стандарта; константы спин-спинового взаимодействия (*J*) указаны в герцах (Гц). Дополнительно для продукта **2h** регистрировали ¹⁹F и ¹³C (с подавлением C–H взаимодействия) ЯМР-спектры на спектрометре Q. One AS600 (“Q. One Americas”, США) с частотой 150.7 МГц для ¹³C-ядер и 563.9 МГц для ¹⁹F-ядер в ДМСО-*d*₆.

ИК-спектры регистрировали на спектрометре Bruker ALPHA (“Bruker BioSpin GmbH”) в тонком слое между пластинами KBr, в области 4000–400 см⁻¹ (16 сканов, разрешение 2 см⁻¹).

Оптическую плотность культур микроорганизмов измеряли на спектрофотометре Varian Cary-50 (“Varian”, США) и микропланшетном фотометре iMark (“Bio-Rad”, США).

Клеточные культуры. Штаммы *C. albicans* ATCC10231 и *S. aureus* ATCC29213 и ATCC43300 (устойчивый к метициллину) были получены из американской коллекции типовых культур (“ATCC”, США). Субкультивирование и приготовление инокулятов проводили в соответствии с рекомендованными Институтом клинических и лабораторных стандартов (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) методами M27-A3 (для культур грибов) и M7-A11 (для бактериальных культур) при температуре инкубации 35°C и 37°C соответственно [18, 19]. Стоковые концентрации клеток *C. albicans* и *S. aureus* составляли 1 × 10⁶ и 1 × 10⁸ клеток/мл соответственно. Рабочую суспензию *C. albicans* (5.0 × 10² клеток/мл) готовили путем двухступенчатого разведения стоковой концентрации средой RPMI-1640. Рабочую суспензию *S. aureus* (1.0 × 10⁶ клеток/мл) готовили разведением стоковой концентрации средой Мюллера-Хинтон.

Синтез эфиров 3,3'-дитиодипропионовой кислоты. Диметилловый эфир дитиодипропионовой кислоты (соединение **1g**). Раствор дитиодипропионовой кислоты (500 мг, 2.38 ммоль) в 15 мл

метанола и 100 мкл серной кислоты кипятили в течение 48 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе гексан–этилацетат (4 : 1). По окончании реакции в смесь вносили насыщенный раствор гидрокарбоната натрия до рН 8.0 и упаривали. Остаток растворяли в смеси вода–этилацетат и экстрагировали этилацетатом (3 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход составил 468 мг (78%). ^1H ЯМР (δ): 3.62 (6H, с, CH_3OOC), 2.92 (4H, т, $J = 6.9$ Гц, CH_2COOMe), 2.72 (4H, т, $J = 6.6$ Гц, CH_2S).

Ди-(2,2,2-трифторэтил)овый эфир дитиодипропионовой кислоты (соединение 1h). Раствор дитиодипропионовой кислоты (400 мг, 1.90 ммоль) в 15 мл трифторэтанола и 100 мкл серной кислоты кипятили в течение 72 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе хлористый метилен–метанол–уксусная кислота (30 : 1 : 0.1). После окончания реакции к смеси добавляли водный раствор аммиака до рН 8.0. Получившийся остаток экстрагировали этилацетатом (3 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход – 153 мг (21%). ^1H ЯМР (δ) : 4.77 (4H, кв, $J = 9.1$ Гц, $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OOC}$), 2.98–2.84 (8H, м, CH_2).

Ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир дитиодипропионовой кислоты (соединение 1i). Раствор дитиодипропионовой кислоты (250 мг, 1.90 ммоль) в 5 мл трихлорэтанола и 50 мкл серной кислоты перемешивали при 140°C в течение 10 сут. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе хлористый метилен–метанол–уксусная кислота (30 : 1 : 0.1). Растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 0.1 М раствором NaOH (20 мл) и 0.1 М раствором соляной кислоты (2 × 20 мл). Органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали от растворителей на ротационном испарителе. Продукт представлял из себя прозрачное масло. Выход – 495 мг (88%). ^1H ЯМР (δ , CDCl_3) : 4.79 (4H, с, $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OOC}$), 3.05–2.90 (8H, м, CH_2).

Синтез диалк(ен)илтиосульфидов. Диметилтиосульфидат (DMTS; соединение 2a). К эмульсии диметилдисульфида (1 г, 10.6 ммоль) в 40 мл воды добавляли 30%-ный раствор перекиси водорода (1.08 мл, 10.6 ммоль) и перемешивали в течение 1 мес. до получения полностью гомогенного раствора. Реакционную массу экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над

сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость. Выход – 1.15 г (98%). ^1H ЯМР (δ , D_2O) : 3.03 (3H, с), 2.65 (3H, с).

Диэтилтиосульфидат (DETS; соединение 2b). К раствору диэтилдисульфида (1 г, 8.18 ммоль) в 10 мл муравьиной кислоты при 0°C медленно, по каплям добавляли 30%-ный раствор перекиси водорода (0.835 мл, 8.18 ммоль) в течение 20 мин и перемешивали 1.5 ч при 0°C. Далее реакционную массу экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали методом колоночной хроматографии в системе *n*-гексан–этилацетат (8 : 1), целевые фракции упаривали от растворителей. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость. Выход – 0.735 г (65%). ^1H ЯМР (δ , CDCl_3) : 3.34 (2H, кв, $J = 7.4$ Гц, $\text{CH}_2\text{S(O)}$), 3.17 (2H, кв, $J = 7.4$ Гц, CH_2S), 1.48 (3H, т, $J = 7.4$ Гц, CH_3), 1.44 (3H, т, $J = 7.4$ Гц, CH_3).

Дипропилтиосульфидат (DPTS; соединение 2c). К раствору дипропилдисульфида (1 г, 6.65 ммоль) в 10 мл муравьиной кислоты при 0°C медленно, по каплям добавляли 30%-ный раствор перекиси водорода (0.679 мл, 6.65 ммоль) в течение 20 мин и перемешивали 4 ч при 0°C. Реакционную массу экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали методом колоночной хроматографии в системе *n*-гексан–этилацетат (8 : 1), целевые фракции упаривали от растворителей. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход – 0.631 г (57%). ^1H ЯМР (δ) : 3.17–3.07 (4H, м, CH_2S), 1.81–1.67 (4H, м, CH_2CH_3), 1.44 (3H, т, $J = 7.3$ Гц, CH_3), 1.02 (3H, т, $J = 7.4$ Гц, CH_3).

Диаллилтиосульфидат (аллицин, DATS; соединение 2d). К раствору свежеперегнанного диаллилдисульфида (1 г, 6.84 ммоль) в 10 мл муравьиной кислоты при 0°C медленно, по каплям вносили 30%-ный водный раствор перекиси водорода (0.680 мл, 6.84 ммоль) в течение 20 мин и перемешивали 4 ч при 0°C. Реакционную массу экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали методом колоночной хроматографии в системе *n*-гексан–этилацетат (10 : 1), целевые фракции упаривали от растворителей. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход – 0.632 г (53%).

^1H ЯМР (δ , CDCl_3): 5.89–5.66 (2H, м), 5.45–5.15 (4H, м), 3.79–3.67 (4H, м).

Синтез диарилтиосульфидата. 2,2'-[(тио)сульфинил]-бис-(пиридин-1-оксид) (соединение **2e**). К раствору 2,2'-дитиодипиридина (100 мг, 0.454 ммоль) в 10 мл CH_2Cl_2 при -78°C по каплям вносили раствор *m*-CPBA (763 мг, 1.362 ммоль) в 15 мл CH_2Cl_2 в течение 20 мин, смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и далее при 40°C в течение 170 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе гексан–этилацетат (4 : 1). К реакционной смеси добавляли 30 мл этилацетата, выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом (2×10 мл) и высушивали над оксидом фосфора. Продукт представлял собой белый аморфный порошок. Выход – 26 мг (21%). ИК-спектр (cm^{-1}): 3200–2600 (уш., ср., ν $\text{C}_{\text{гетаром.}}-\text{H}$), 1617, 1599, 1521, 1458 (ср., ν $\text{C}_{\text{гетаром.}}=\text{C}_{\text{гетаром.}}$) 1268, 1245, 1207 (в., ν C–N), 1149, 1040 (с., ν S–S=O), 769, 730 (ср., ν C–S=O), 672 cm^{-1} (сл., ν C–S). ^1H ЯМР (δ): 8.7 (2H, д, $J = 5.1$ Гц, N–CH), 8.51 (1H, дд, $J = 1.5$ Гц, $J = 7.8$ Гц, Ar–H), 8.50 (1H, дд, $J = 1.5$ Гц, $J = 7.8$ Гц, Ar–H), 8.15 (2H, д, $J = 7.9$ Гц, N–CH), 7.96–7.91 (2H, м, Ar–H). ^{13}C ЯМР (δ): 157.64, 146.74, 143.16, 127.51, 123.95.

Синтез тиосульфидатных производных диалкилкарбоксилатов. 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовая кислота (соединение **2f**). К суспензии 3,3'-дитиодипропионовой кислоты (250 мг, 1.19 ммоль) в 10 мл CH_2Cl_2 при -78°C по каплям вводили раствор *m*-CPBA (267 мг, 1.19 ммоль) в 15 мл CH_2Cl_2 в течение 20 мин, смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе хлористый метилен–метанол–уксусная кислота (30 : 1 : 0.1). Растворители упаривали на ротационном испарителе, остаток еще раз упаривали с этанолом и высушивали в вакууме. Продукт очищали методом колоночной хроматографии в системе хлористый метилен–метанол–уксусная кислота (50 : 1 : 0.1), целевые фракции упаривали от растворителей. Продукт представлял собой белый порошок. Выход – 86 мг (32%). ИК-спектр (cm^{-1}): 3550–2500 (уш., ν COO–H), 1699 (с., ν C=O), 1432 (ср., $\delta_{\text{ас}}$ C–H), 1410, 1315, 1247, 1166, 1049 (ср., ν S–S=O), 720 (ср., ν C–S=O), 655 (сл., ν C–S). ^1H ЯМР (δ): 3.79 (2H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_2COOH), 3.29 (2H, т, $J = 6.8$ Гц, CH_2COOH), 2.75 (2H, т, $J = 6.8$ Гц, $\text{CH}_2\text{S(O)}$), 2.72 (2H, т, $J = 7.1$ Гц, CH_2S). ^{13}C ЯМР (δ): 172.90, 171.53, 56.81, 34.42, 31.30, 28.95.

Диметиловый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты (соединение **2g**). К раствору диметилдитиодипропионата (455 мг, 1.91 ммоль) в 10 мл CH_2Cl_2 при -78°C по каплям

добавляли раствор *m*-CPBA (427 мг, 1.91 ммоль) в 15 мл CH_2Cl_2 в течение 20 мин, смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ в системе гексан–этилацетат (4 : 1). Через 170 ч растворитель упаривали, продукт очищали методом флеш-хроматографии в градиенте гексан–этилацетат (5 : 1) → этилацетат. Продукт представлял собой прозрачную вязкую жидкость с желтоватым оттенком. Выход – 68 мг (14%). ИК-спектр (cm^{-1}): 2999 (уш., сл., ν C–H (CH_2)), 2955 (ср., ν C–H (CH_3)), 1737 (с., ν C=O), 1438 (ср., $\delta_{\text{ас}}$ C–H), 1418, 1362, 1227–1178 (уш., с., ν C–O), 1049 (с., ν S–S=O), 672 (сл., ν C–S). ^1H ЯМР (δ): 3.64 (3H, с, CH_3OOC), 3.63 (3H, с, CH_3OOC), 3.50–3.30 (4H, м, CH_2COOMe), 2.83–2.77 (4H, м, CH_2S). ^{13}C ЯМР (δ): 171.80, 171.70, 52.31, 52.07, 50.60, 35.61, 27.80, 27.68.

Ди-(2,2,2-трифторэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты (соединение **2h**). К раствору ди-(2,2,2-трифторэтил)-3,3'-дитиодипропионата (153 мг, 0.41 ммоль) в CH_2Cl_2 при -78°C по каплям добавляли раствор *m*-CPBA (92 мг, 0.41 ммоль) в 15 мл CH_2Cl_2 в течение 20 мин, смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе гексан–этилацетат (2 : 1). Продукт очищали методом флеш-хроматографии в градиенте гексан–этилацетат (5 : 1) → этилацетат, высушивали от растворителей на ротационном испарителе и получали соединение **2h** в виде прозрачной вязкой жидкости с желтоватым оттенком. Выход – 59 мг (37%). ^1H ЯМР (δ): 4.77 (2H, кв, $J = 9.1$ Гц, $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OOC}$), 4.76 (2H, кв, $J = 9.1$ Гц, $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OOC}$), 3.55–3.36 (4H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.97–2.91 (4H, м, CH_2S), 2.83–2.77 (4H, м, CH_2S). ^{13}C ЯМР (150.7 МГц, δ): 170.17 ($2 \times$ с), 123.90 ($2 \times$ кв, $J = 279$ Гц), 60.35 ($2 \times$ кв, $J = 35$ Гц), 50.26, 35.34, 27.58, 27.50. ^{19}F ЯМР (563.9 МГц, δ): –72.29 ($2 \times$ т, $J = 11.3$ Гц).

Ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовой кислоты (соединение **2i**). К раствору 2,2,2-трихлорэтилдитиодипропионата (905 мг, 1.913 ммоль) в 10 мл CH_2Cl_2 при -78°C по каплям вносили раствор *m*-CPBA (432 мг, 1.913 ммоль) в 15 мл CH_2Cl_2 в течение 20 мин, смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем 48 ч при комнатной температуре. Протекание реакции контролировали методом ТСХ в системе гексан–этилацетат (4 : 1). Продукт очищали методом колоночной хроматографии в градиенте гексан–этилацетат (10 : 1) → (4 : 1) и получали соединение **2i** в виде прозрачного масла. Выход – 168 мг (18%). ИК-спектр (cm^{-1}): 3009 (сл., ν C–H (CH_2CCl_3)), 2959, 2943, 2928 (сл., ν C–H), 1761 (с., ν C=O), 1429, 1405, 1379 (ср., $\delta_{\text{ас}}$ C–H), 1272, 1207–1137

(уш., с., ν C–O), 1073 (с., ν S–S=O), 846, 797 (ср., ν C–Cl), 717 (ср., ν C–S=O), 650 (сл., ν C–S). ^1H ЯМР (δ , ацетон- d_6): 4.90 (2H, с, $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OOC}$), 4.89 (2H, с, $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OOC}$), 3.60–3.40 (4H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 3.15–2.95 (4H, м, CH_2S). ^{13}C ЯМР (δ): 170.06, 170.00, 95.58, 95.52, 73.97, 73.80, 50.27, 35.62, 27.73, 27.59.

Определение минимальных ингибирующих концентраций тиосульфидов. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) определяли методом двукратных серийных разведений согласно CLSI M27-A3 [18] и M07-A11 [19] в трех независимых экспериментах с тремя повторами в каждом. В качестве положительно го контроля в случае *S. albicans* использовали флуконазол, для *S. aureus* – ванкомицин. Стоко вый раствор аллицина готовили в ДМСО в концентрации 6400 мкг/мл; для остальных веществ – в стерильной воде в концентрации 1280 мкг/мл. Стоковые растворы препаратов разбавляли до конечных концентраций в среде для анализа и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов, после чего добавляли по 100 мкл инокулята. Ряды 11 и 12 оставляли для отрицательного контроля (среда с инокуля том без препарата) и контроля стерильности. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 35°C для *S. albicans* и при 37°C для *S. aureus*. Тестируемый диапазон концентра ций для флуконазола и соединений **2a**, **2d**, **2h**, **2g**, **2f** составлял от 0.125 до 64 мкг/мл; для ванкомицина и соединений **2b**, **2c**, **2e**, **2i** – от 0.0625 до 32 мкг/мл. Значение МПК определяли спектрофотометрически. За МПК принимали наименьшую концентрацию препарата,

вызывающую значительное (~80% для флу коназола) или полное (все другие препараты) подавление роста микроорганизма по сравне нию с контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез природных тиосульфидов и их аналогов: арилтиосульфидов и тиосульфидных производных диалкилдикарбоксилатов

Природный компонент аллицин обладает широким спектром противомикробного дей ствия, но при этом имеет низкую стабиль ность [14]. Его аналоги, например диметил тиосульфидат, механизм действия которого аналогичен аллицину, более стабильны. В ходе работы были получены как природные ал кил-аналоги аллицина (**2a–2c**), действующие одновременно против патогенных грибов и бактерий, так и синтезированы новые тио сульфидные производные (**2e–2i**) аллицина (рис. 1) с замещенными фрагментами алкил карбоксилатов и их эфиров, а также остатком пиридин-N-оксида. Последнее производное относится к привилегированной структуре в медицинской химии [20] и служит мимети ком малоизученного противомикробного ком понента лука (*Allium stipitatum*) – 2-(метилди тио)пиридин-3-карбонитрила [21].

К основным методам получения алифати ческих тиосульфидов относится воздействие смеси 30%-ного раствора перекиси водоро да и муравьиной кислоты на дисульфид [14, 22, 23]. В результате в реакционной смеси *in situ* ге-

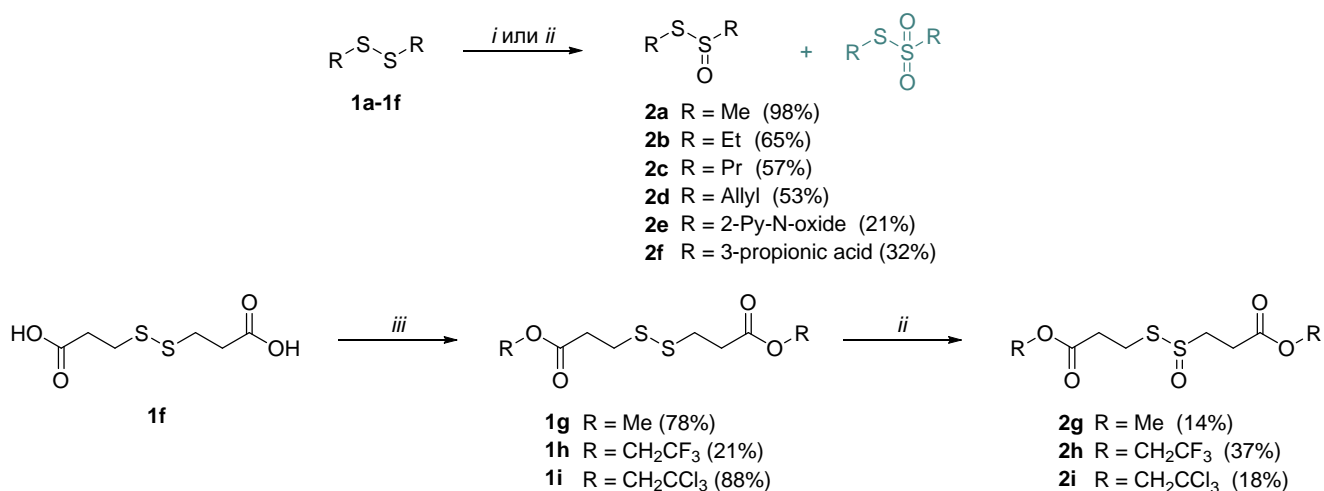


Рис. 1. Схема синтеза тиосульфидов. Реагенты и общие условия: (i) H_2O_2 , HCOOH , 0°C; (ii) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , $-78^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$; (iii) ROH, кипячение, H_2SO_4 . В скобках указан выход продукта. Обозначения: Me – метильная группа, Et – этильная группа, Pr – пропильная группа, Allyl – аллильная группа, Py-N-oxide – пиридин-N-оксид, propionic acid – пропионовая кислота.

нерируется пермуравьиная кислота, которая и действует как окислитель на дисульфидную связь. В качестве альтернативного окислителя применяют *meta*-хлорпербензойную кислоту (*m*-CPBA) [22]. Оба метода требуют поддержания низких температур: 0–4°C в случае перекиси водорода и –78°C в случае *m*-CPBA. Однако даже при соблюдении заданного температурного режима происходит образование побочных продуктов — сульфонов. Именно поэтому для выделения каждого из продуктов **2a–2i** пришлось вводить стадию очистки с использованием колоночной хроматографии.

В случае диалкилдикарбоксилатов и их производных (**1f–1i**) было обнаружено, что при “мягком” окислении, под действием 30%-ного раствора H₂O₂ и муравьиной кислоты, образуются лишь следовые количества продуктов. Вероятно, это вызвано сильным электроноакцепторным влиянием карбоксильных заместителей, которые приводят к электронодефицитному состоянию атомов серы. В связи с этим мы применили более “жесткий” окислитель — *m*-CPBA — и повысили температурный режим реакции. В таких условиях образовался как целевой продукт, так и значительное количество сульфона.

Синтез соединений **1g** и **1h** выполняли при кипячении соответствующего спирта с дикислотой **1f** в присутствии каталитических количеств серной кислоты. В случае соединения **1i** реакцию проводили при 140°C — чтобы избежать разложения 2,2,2-трихлорэтанола. Выбор галогенсодержащих спиртов в роли заместителей был проведен на основании теоретического анализа стабильности образуемых ими дисульфидов и соответствующих тиосульфидов. Кроме того, при разложении 2,2,2-трифторэтил- и 2,2,2-трихлорэтилкарбоксилатов ожидали образования менее токсичных и хорошо экскретируемых из организма продуктов по сравнению с другими вариантами замещенных галогенэфиров [24].

Синтезированные соединения охарактеризованы физико-химическими методами анализа, для ранее описанных тиосульфидов **2a–2d** данные соответствовали ранее опубликованным [17].

*Противомикробная активность
диалк(ен)илтиосульфидов и их аналогов
в отношении культур C. albicans ATCC10231
и S. aureus ATCC29213 и ATCC43300*

Для оценки противомикробной активности диалк(ен)илтиосульфидов, диарилтиосульфидов и тиосульфидных производных диалкилдикарбоксилатов в отношении *C. albicans* и *S. aureus* использовали метод серийных разведений с определением величины МПК для каждого соединения. Анализ проводили на контрольных штаммах: *C. albicans* ATCC10231 и *S. aureus* ATCC29213, — рекомендованных для

использования в лабораторных исследованиях. Также действие соединений было проверено на устойчивом к метициллину и оксациллину штамме *S. aureus* ATCC43300.

Диэтилтиосульфидат (**2b**) и дипропилтиосульфидат (**2c**) в отношении штаммов *S. aureus* ATCC29213 и ATCC43300 оказались одинаково малоэффективны (МПК ~200 мкМ, табл. 1). Чувствительность *S. aureus* к действию диметилтиосульфидата (**2a**) для штамма ATCC29213 (МПК 272 мкМ) снизилась более чем на 30%, по сравнению с действием диэтилтиосульфидата и дипропилтиосульфидата. Диметилтиосульфидат оказался неэффективен в отношении MRSA штамма ATCC (МПК 435 мкМ). Оба штамма *S. aureus* также были нечувствительны к действию алицина (**2d**) в диапазоне тестируемых концентраций (МПК > 400 мкМ). Высокие значения МПК для этого соединения соответствовали ранее полученным A. Muller и др. [13] для штаммов *S. aureus* ATCC DSM 20231 и ATCC43300. Авторами этой работы было показано, что алицин действует на культуру *C. albicans*, причем для штамма DSM 1386 значение МПК было в два раза ниже (196 мкМ) полученного для алицина на клетках *S. aureus*. Ранее мы определили, что значения МПК для диалк(ен)илтиосульфидатов в отношении штамма *C. albicans* ATCC10231 находятся в пределах 4.1–20 мкМ [17]. Эти величины почти на два порядка меньше, чем МПК для штаммов стафилококка (табл. 1).

Таким образом, бактерии *S. aureus* менее чувствительны к действию диалк(ен)илтиосульфидатов, чем грибы *C. albicans*. Это коррелирует с данными исследования по изучению противомикробных свойств аналогичных соединений в отношении грамположительных бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Micrococcus luteus*) и дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae*. В этой работе R. Leontiev с соавт. [14] показали, что противогрибковая активность диалк(ен)илтиосульфидатов выше, чем антибактериальная. По приведенным в табл. 1 данным видно, что из всех исследованных нами диалк(ен)илтиосульфидатов максимальной противомикробной активностью обладает дипропилтиосульфидат (**2c**).

Значения МПК для серии синтетических аналогов тиосульфидатов: диарилтиосульфидата и тиосульфидных производных диалкилдикарбоксилатов — находились в диапазоне концентраций от 2.78 до более 282 мкМ (табл. 1). Показано, что 2,2'-[(тио)сульфинил]-бис-(пиридин-1-оксид) (**2e**) и 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропионовая кислота (**2f**) не оказывали ингибирующего действия ни на грибы, ни на бактерии в терапевтически значимых концентрациях (МПК > 100 мкМ).

Таблица 1. Значения МПК для синтетических тиосульфидов и коммерческих антимикробных препаратов в отношении *C. albicans* и *S. aureus*

Соединение	МПК ^a					
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>S. aureus</i> ATCC 43300	
	мкг/мл	мкМ	мкг/мл	мкМ	мкг/мл	мкМ
2a (DMTS)	2.68 ± 0.57	24.32 ± 5.17 ^b	30.0 ± 4.73	272.2 ± 42.9	48.0 ± 14.3	435.6 ± 129.8
2b (DETS)	0.72 ± 0.16 ^b	5.21 ± 1.15 ^b	≥32.0	≥231.4	≥32.0	≥231.4
2c (DPTS)	0.69 ± 0.26 ^b	4.15 ± 1.54 ^b	≥32.0	≥192.4	≥32.0	≥192.4
2d (DATS)	3.31 ± 1.10 ^b	20.39 ± 6.65 ^b	>64	>394.3	>64	>394.3
2e	>32	>119.3	>32	>119.3	>32	>119.3
2f	>64	>282.8	>64	>282.8	>64	>282.8
2g	5.44 ± 1.16	21.39 ± 4.56	>64	>251.7	>64	>251.7
2h	2.24 ± 0.50	5.74 ± 1.28	>64	>164.0	>64	>164.0
2i	1.36 ± 0.23	2.78 ± 0.47	6.50 ± 1.73	13.29 ± 3.54	10.0 ± 5.36	20.45 ± 10.96
Флуконазол	0.85 ± 0.17	2.76 ± 0.56	н/о ^c			
Ванкомицин	н/о		1.86 ± 0.35	1.28 ± 0.24	2.5 ± 0.77	1.72 ± 0.53

^aРезультаты представлены как среднее ± 95%-ный доверительный интервал.

^bПриведены данные из работы [17, Creative Common CC BY license].

^cНе определяли.

В то же время более липофильные эфиры, такие как диметилловый (**2g**), ди-(2,2,2-трифторэтил)овый (**2h**) и ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропиононовой кислоты (**2i**), проявляли выраженную антиканцерогенную активность (МПК 2.78–21 мкМ), что, по всей видимости, связано с их лучшей проницаемостью мембран патогенов по сравнению с отрицательно заряженной кислотой **2f**. Наиболее универсальным противомикробным препаратом, действующим как на грибы, так и на бактериальные клетки, оказалось соединение **2i** – ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропиононовой кислоты (МПК 2.78–20 мкМ). Низкие значения МПК, сравнимые с таковыми для известных коммерческих противогрибковых и антибактериальных препаратов, позволяют рассматривать соединение **2i** как перспективное для использования в клинической практике.

Таким образом, синтезирован ряд природных диалк(ен)илтиосульфидов и их новых синтетических аналогов и оценена их антибактериальная и антимикотическая активность на клинически значимых патогенах: бактериях *S. aureus* и грибах *C. albicans*. Показано, что некоторые соединения этого класса облада-

ют выраженными противогрибковыми свойствами, эффективно подавляя рост *C. albicans* в концентрациях до 10 мкМ. Среди всех полученных соединений ди-(2,2,2-трихлорэтил)овый эфир 3,3'-[(тио)сульфинил]дипропиононовой кислоты (**2i**) оказывал наиболее выраженное противомикробное действие как на штаммы *S. aureus* (МПК 13–20 мкМ), так и на *C. albicans* (МПК 2.78 мкМ), которое сравнимо с применяемыми лекарственными средствами. Это позволяет рассматривать соединение **2i** в качестве перспективного кандидата в противомикробные препараты. Полученные результаты формируют основу для создания новых универсальных лекарственных средств против полимикробных инфекций, при терапии которых имеющиеся в арсенале коммерческие препараты могут быть малоэффективны и/или требуют использования высоких терапевтических доз.

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда (грант № 23-24-00151).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108.
- Nobile C.J., Johnson A.D. (2015) *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 71–92.
- Wolcott R., Costerton J.W., Raoult D., Culter S.J. (2013) The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, 107–112.
- Goetghebeur M., Landry P.A., Han D., Vicente C. (2007) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a public health issue with economic consequences. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **18**, 27–34.
- Silva-Santana G., Lenzi-Almeida K.C., Lopes V.G.S., Aguiar-Alves F. (2016) Biofilm formation in catheter-related infections by panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Int. Microbiol.* **19**, 199–207.
- Peters B.M., Jabra-Rizk M.A., O'May G.A., Costerton J.W., Shirtliff M.E. (2012) Polymicrobial interactions in biofilms: impact on pathogenesis and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 193–213.
- Klotz S.A., Chasin B.S., Powell B., Gaur N.K., Lipke P.N. (2007) Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**, 401–406.
- Pfaller M.A., Diekema D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163.
- Harriott M.M., Noverr M.C. (2010) Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3746–3755.
- Lebeaux D., Ghigo J.M., Beloin C. (2014) Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 510–543.
- Borlinghaus J., Albrecht F., Gruhlke M.C.H., Nwachukwu I.D., Slusarenko A.J. (2014) Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules.* **19**, 12591–12618.
- Sharifi-Rad J., Hoseini Alfatemi S., Sharifi Rad M., Iriti M. (2014) Antimicrobial synergic effect of allicin and silver nanoparticles on skin infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spp. *Ann. Med. Health Sci. Res.* **4**(6), 863–868.
- Muller A., Eller J., Albrecht F., Prochnow P., Kuhlmann K., Bandow J.E., Slusarenko A.J., Leichert L.I.O. (2016) Allicin induces thiol stress in bacteria through S-allylmercapto modification of protein systems. *J. Biol. Chem.* **291**, 11477–11490.
- Leontiev R., Hohaus N., Jacob C., Gruhlke M.C.H., Slusarenko A.J. (2018) A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. *Sci. Rep.* **8**, 6763.
- Revtovich S., Morozova E., Kulikova V., Koval V., Anufrieva N., Nikulin A., Demidkina T. (2020) Sulfoxides of sulfur-containing amino acids are suicide substrates of *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase. Structural bases of the enzyme inactivation. *Biochimie.* **168**, 190–197.
- Anufrieva N.V., Morozova E.A., Kulikova V.V., Bazhulina N.P., Manukhov I.V., Degtev D.I., Gnuchikh E.Y., Rodionov A.N., Zavilgelsky G.B., Demidkina T.V. (2015) Sulfoxides, analogues of L-methionine and L-cysteine as pro-drugs against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Naturae.* **7**(27), 128–135.
- Revtovich S., Lyfenko A., Tkachev Y., Kulikova V., Koval V., Puchkov V., Anufrieva N., Solyev P., Morozova E. (2023) Anticandidal activity of *in situ* methionine γ -lyase-based thiosulfinate generation system vs. synthetic thiosulfates. *Pharmaceuticals.* **16**(12), 1695.
- (2008) M27-A3 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. (2008) *National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Wayne PA.* **28**(14). https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf
- (2018) M07–A11 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA.* 11th edition. **38**(2). https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf
- Marinescu M., Popa C.V. (2022) Pyridine compounds with antimicrobial and antiviral activities. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(10), 5659.
- Karunanidhi A., Ghaznavi-Rad E., Jeevajothi Nathan J., Joseph N., Chigurupati S., Mohd Fauzi F., Pichika M.R., Hamat R.A., Lung L.T.T., van Belkum A., Neela V. (2019) Bioactive 2-(methylidithio)pyridine-3-carbonitrile from persian shallot (*Allium stipitatum* Regel.) exerts broad-spectrum antimicrobial activity. *Molecules.* **24**(6), 1003.
- Roseblade A., Ung A., Bebawy M. (2017) Synthesis and *in vitro* biological evaluation of thiosulfinate derivatives for the treatment of human multidrug-resistant breast cancer. *Acta Pharm. Sinica.* **38**(10), 1353–1368.
- Stellenboom N., Hunter R., Cairn M.R., Bourne S.A., Cele, K. Qwebani T., le Roex T. (2007) Synthesis and inclusion of S-aryl alkylthiosulfates as stable allicin mimics. *ARKIVOC.* **9**, 53–63.
- Mehendale H.M. (2010) 7.19 – Halogenated hydrocarbons. In: *Comprehensive Toxicology*, 2nd edition, vol. 7. Ed. McQueen C.A. Elsevier, pp. 459–474. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00824-1>

Synthesis and Antimicrobial Activity of Thiosulfinates, Allicin Analogues

V. M. Puchkov¹, A. D. Lyfenko¹, V. S. Koval¹, S. V. Revtovich¹, V. V. Kulikova¹,
N. V. Anufrieva¹, A. S. Zemskaya¹, E. A. Morozova^{1, *}, P. N. Solyev¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: elmorozova@yahoo.com

Diallyl thiosulfinate (allicin) effectively inhibits the growth of various microorganisms, including antibiotic-resistant strains, so it can be considered a broad-spectrum antimicrobial compound. However, its instability in the bloodstream hinders its use as a therapeutic agent. We have synthesized a number of allicin analogues, both natural and synthetic, and evaluated *in vitro* their antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The synthesized compounds were shown to exhibit more pronounced antifungal activity than antibacterial one. Among the compounds obtained, synthetic di-(2,2,2-trichloroethyl) ester of 3,3'-[(thio)sulfinyl]dipropionic acid effectively inhibited the growth of both fungi and bacteria at concentrations comparable to those of known antimicrobial agents used in medical practice.

Keywords: allicin, thiosulfinates, antimicrobial activity, polymicrobial infection, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*

ПОЛУЧЕНИЕ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

УДК 577.152.314:576.08+576.535.5:576.52

РАЗРАБОТКА НОВОГО ИНГИБИТОРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦИСТАТИОНИН- γ -ЛИАЗЫ НА ОСНОВЕ 6-БРОМИНДОЛА И АМИНОТИОФЕНА

© 2024 г. Р. А. Новиков^{a, b}, Д. Н. Платонов^b, А. Ю. Белый^b, К. В. Потапов^{a, b},
М. А. Новиков^{a, b}, Ю. В. Томилов^b, О. И. Кечко^a,
Т. А. Серегина^a, П. Н. Сольев^{a, *}, В. А. Митькевич^a

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^bИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского

Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: solyev@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2024 г.

После доработки 27.06.2024 г.

Принята к публикации 02.07.2024 г.

Цистатионин- γ -лиаза (CSE) – ключевой фермент генерации сероводорода у таких патогенных бактерий, как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и других. Подавление активности CSE значительно усиливает чувствительность бактерий к действию антибиотиков. Нами разработан метод синтеза нового ингибитора CSE индольного ряда – 3-амино-5-[(6-бром-1*H*-индол-1-ил)метил]тиофена (MNS1). Синтез этого соединения базируется на модификации замещенного тиофена в качестве основного структурного фрагмента, который на финальных стадиях вовлекается в алкилирование 6-броминдола. Константа диссоциации комплекса MNS1 с SaCSE (цистатионин- γ -лиаза *S. aureus*) составляет 0.5 мкМ, что на порядок ниже, чем для CSE человека (hCSE). Показано, что соединение MNS1 эффективно усиливает антибактериальное действие гентамицина на клетки *Bacillus subtilis*, что предполагает его использование в качестве потенциатора антибиотиков для подавления роста бактериальных клеток, экспрессирующих CSE.

Ключевые слова: цистатионин- γ -лиаза, SaCSE, соединения индольного ряда, потенциатор антибиотика, гентамицин, *Bacillus subtilis*

DOI: 10.31857/S0026898424060083, **EDN:** IAYTTU

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим открытием XX века в области медицинской химии стали антибиотики, разработка которых помогла спасти миллионы жизней от смертельных инфекций. Появление антибиотиков позволило существенно снизить смертность от бактериальных инфекций, увеличило среднюю продолжительность жизни более чем на 30 лет, сократило риски, возникающие при хирургических вмешательствах, и способствовало устойчивому развитию сельскохозяйственного производства. Однако на рубеже XX и XXI века “золотая эра” антибиотиков закончилась и внимание ученых и клиницистов переключилось на серьезную проблему, возникшую в результате

повсеместного применения этих препаратов, – на выработавшуюся антибиотикорезистентность штаммов бактериальных патогенов. Назревающая угроза от резистентных патогенов, известных как ESKAPE (аббревиатура от *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Enterobacter* spp.), и отсутствие новых классов антибиотиков за последние 60 лет требует развития новых стратегий терапии [1]. В числе активно развивающихся подходов – разработка терапии потенциаторами антибиотиков, действие которых направлено на ингибирование ферментов, вовлеченных в биосинтез сероводорода. Мишенями в комбинированной терапии с использованием

известных классов антибиотиков для потенциаторов могут служить белки, не критичные для нормального жизненного цикла бактерии, но активно участвующие в процессе инфицирования клеток и отвечающие за возникновение бактериальной вирулентности. Одной из таких мишеней для действия потенциаторов антибиотиков считается фермент метаболизма сероводорода — бактериальная цистатионин- γ -лиаза (CSE). Ингибирование активности CSE не блокирует рост бактерий, но подавляет их способность приспосабливаться к известным антибиотикам и продуцировать сероводород, защищающий бактерию от окислительного стресса. Недавно в результате *in silico* и *in vitro* скринингов показано, что можно подобрать ряд ингибиторов на основе 6-броминдола (NL1, NL2 и NL3), селективно подавляющих бактериальный вариант этого фермента из CSE *S. aureus* (SaCSE) и *P. aeruginosa* (PaCSE) [2]. Возможность применения этих соединений в роли потенциаторов для многократного усиления действия антибиотиков на патогенные бактерии, включая штаммы, обладающие высокой резистентностью к действию известных противомикробных препаратов, позволяет считать потенциаторы перспективным, но все еще мало изученным классом фармакологически значимых соединений.

В результате проведенного исследования мы расширили класс 6-броминдолсодержащих соединений новым представителем, названным MNS1, и проанализировали его связывание с CSE бактериального происхождения (SaCSE) и человека (hCSE), а также эффективность MNS1 как потенциатора гентамицина в отношении штамма *B. subtilis* 168 и ингибитора H_2S -генерирующей активности этой бактерии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Реагенты и растворители были приобретены у “Sigma-Aldrich” (США), “Acros Organics” (США), “J&K Scientific” (США), “TCI Europe” (Бельгия), “Macklin” (Китай) со степенью чистоты не ниже 98% и использованы без дополнительной очистки, если иное не указано.

Оборудование. Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластины Silufol (“Avalier”, Чехия) и KieselGel F₂₅₄ (“Merck”, Германия), колоночную хроматографию проводили на Silica Gel 60 (0.040–0.063 mm) (“Merck”).

ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах AVANCE II 300 (“Bruker Corporation”, США) с рабочей частотой 300.1 МГц и 75.5 МГц для ядер 1H и ^{13}C соответственно, а также АМХ III 400 (“Bruker Corporation”) с рабочей частотой 400.1 МГц и 100.6 МГц для ядер 1H и ^{13}C соответственно. Для анализа образцов исполь-

зовали $CDCl_3$ с 0.05% Me_4Si в качестве внутреннего стандарта и $DMSO-d_6$.

Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на гибрид-квадрупольном времяпролетном приборе micrOTOF-Q II (“Bruker Daltonics GmbH & Co. KG”, Германия) методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполняли на положительных ионах, образцы подавали в распылительную камеру масс-спектрометра через жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity (“Agilent Technologies”, США) по стандартной методике [3].

Синтез 3-амино-5-[(6-бром-1*H*-индол-1-ил)метил]тиофена (MNS1). Синтез проводили на стандартном лабораторном оборудовании по разработанным ниже методикам.

Метил 3-аминотиофен-2-карбоксилат (1). К раствору метилата натрия, полученному при растворении металлического натрия (2.6 г, 113.0 моль) в 50 мл метанола, при охлаждении на водяной бане, по каплям добавляли метилтиогликолят (5.3 г, 49.9 ммоль) и затем раствор 2-хлоракилонитрила (4.4 г, 49.9 ммоль) в 5 мл метанола. Полученную смесь перемешивали 2 ч, после чего отгоняли в вакууме 2/3 первоначального объема метанола из реакционной смеси, а остаток разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали Et_2O (3×30 мл). Органические фракции объединяли, сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Продукт очищали перекристаллизацией из гексана. Соединение **1** получено в виде желтых кристаллов (4.7 г, выход 61%). 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$), δ : 7.27 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H), 6.54 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H) 5.44 (уш.с., 2H), 3.83 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (75 МГц, $CDCl_3$), δ : 165.1, 154.0, 131.4, 119.8, 101.2, 51.3. Масс-спектр $C_6H_7NO_2S$, m/z : для $[M+H]^+$ рассчитано 158.0270, получено 158.0274; рассчитано для $[2M+H]^+$ 315.0468, получено 215.0477.

Метил 3-[(*mpe*т-бутоксикарбонил)амино]тиофен-2-карбоксилат (2). К раствору **1** (2.0 г, 12.7 ммоль) в CH_2Cl_2 добавляли Woc_2O (4.1 г, 18.8 ммоль) и *n*-диметиламинопиридин (77 мг, 0.63 ммоль). Реакционную массу перемешивали 3 ч и упарили в вакууме досуха. Остаток растворяли в $EtOAc$ и последовательно промывали насыщенными растворами $NaHCO_3$, лимонной кислоты и $NaCl$. Органический слой сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Продукт получен в виде желтых кристаллов (2.42 г, выход 74%) и использован на следующей стадии без дополнительной очистки и анализа физико-химических свойств.

Метил 3-[(*mpe*т-бутоксикарбонил)амино]-5-формилтиофен-2-карбоксилат (3). К раствору диизопропиламина (11.9 г, 117 ммоль) в 50 мл абсолютного ТНФ в атмосфере аргона, при температуре смеси не выше $-50^\circ C$ добавляли

по каплям 2.5 М раствор бутиллития в гексане (42 мл, 104 ммоль). К полученному раствору, охлажденному до -78°C , добавляли раствор соединения **2** (8.4 г, 32.7 ммоль) в 30 мл THF. Реакционную смесь перемешивали 45 мин при -78°C , после чего добавляли к ней абсолютированный DMF (12.0 г, 118 ммоль), удерживая температуру раствора ниже -65°C . Смесь выдерживали 15 мин при -78°C , после чего нагревали до -30°C и обрабатывали водным раствором 6 М соляной кислоты (36.8 мл, 221 ммоль). После стабилизации температуры к суспензии добавляли воду – до полного растворения LiCl. Органическую фазу отделяли, промывали насыщенным раствором NaCl (3×50 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Соединение **3** очищали кристаллизацией из метанола, получали светло-желтые кристаллы (6.8 г, выход 73%). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3), δ : 9.94 (с, 1H), 9.27 (с, 1H), 8.55 (с, 1H), 3.92 (с, 3H), 1.54 (с, 9H). ^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3), δ : 183.8, 164.4, 152.0, 145.4, 145.0, 128.6, 114.8, 81.8, 52.5, 28.3. Масс-спектр $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$, m/z : рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 286.0744, получено 286.0747.

Метил-3-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-5-(гидроксиметил)тиофен-2-карбоксилат (4). При 0°C к суспензии соединения **3** (9.67 г, 33.9 ммоль) в смеси 250 мл этанола и 250 мл воды добавляли боргидрид натрия (0.62 г, 16.3 ммоль). Смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 1 ч при комнатной температуре, после чего в течение 2 ч двумя порциями добавляли еще боргидрид натрия (0.62 г, 16.3 ммоль). Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре 1 ч, после чего разбавляли 500 мл воды. Смесь экстрагировали этилацетатом (2×250 мл). Органические слои объединяли, сушили над MgSO_4 и упаривали в вакууме. Соединение **4** получали в виде желтых кристаллов (9.35 г, выход 96%). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3), δ : 9.31 (с, 1H), 7.78 (с, 1H), 4.80 (с, 2H), 3.86 (с, 3H), 1.51 (с, 9H). ^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3), δ : 164.7, 152.2, 151.1, 145.4, 118.6, 107.3, 81.3, 60.7, 51.8, 28.3. Масс-спектр $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{S}$, m/z : рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 288.0900, получено 288.0906.

Метил-5-(бромметил)-3-[(трет-бутоксикарбонил)амино]тиофен-2-карбоксилат (5). К раствору соединения **4** (5.89 г, 20.5 ммоль) и трифенилфосфина (6.47 г, 24.6 ммоль) в 50 мл CH_2Cl_2 при 0°C небольшими порциями добавляли CBr_4 (8.19 г, 24.6 ммоль). Реакционную массу перемешивали 30 мин при 0°C и 2 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривали в вакууме. Продукт экстрагировали из твердого остатка смесью Et_2O и гексана (1 : 1). Органические соли объединяли, пропускали через слой силикагеля и упаривали в вакууме. Получали 5.74 г соединения **5** в виде белого порошка (выход 80%). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3), δ : 9.29 (с, 1H), 7.94 (с, 1H), 4.59 (с, 1H), 3.86 (с, 3H), 1.51 (с, 9H). Масс-спектр

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrNO}_4\text{S}$, m/z : рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 350.0056, получено 350.0059.

Метил 5-[(6-бром-1H-индол-1-ил)метил]-3-[(трет-бутоксикарбонил)амино]тиофен-2-карбоксилат (6). К раствору 6-броминдола (1 г, 5.1 ммоль) в 18 мл абсолютированного DMF при 0°C добавляли гидрид натрия (204 мг, 60%-ная дисперсия в масле; 5.1 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до прекращения выделения водорода в течение 2 ч. К полученному раствору добавляли раствор соединения **5** (1.61 г, 4.6 ммоль) в 2 мл абсолютированного DMF. Реакционную массу выдерживали при 0°C в течение 24 ч, после чего разбавляли 100 мл воды. Смесь экстрагировали EtOAc (3×50 мл), органические слои объединяли, промывали водой (3×50 мл) и насыщенным раствором NaCl (3×50 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Вещество очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя толуол в качестве элюента. Получено 856 мг соединения **6** в виде желтоватого масла (выход 40%). ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 9.20 (с, 1H), 7.83 (с, 2H), 7.72 (с, 2H), 7.63–7.45 (м, 3H), 7.20–7.14 (м, 1H), 6.54 (д, $J = 3.3$ Гц, 2H), 5.69 (с, 3H), 3.74 (с, 3H), 1.46 (с, 9H). Масс-спектр $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$, m/z : рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 465.0478, получено 465.0481.

5-[(6-бром-1H-индол-1-ил)метил]тиофен-3-амин гидрохлорид (7, MNS1). К раствору NaOH (19 мг, 0.475 ммоль) в 2 мл метанола и 0.2 мл воды добавляли соединение **6** (146 мг, 0.314 ммоль). Полученную смесь кипятили 8 ч, после чего охлаждали, подкисляли водным раствором соляной кислоты (24 мкл, 0.942 ммоль) и перемешивали еще в течение 1 ч. Образовавшийся осадок NaCl отфильтровали, фильтрат упаривали и высушивали в вакууме. Продукт **7** выделен в виде коричневого порошка (96 мг, выход 89%). ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 7.87–7.73 (м, 1H), 7.59–7.37 (м, 2H), 7.20–7.11 (м, 1H), 6.78–6.68 (м, 1H), 6.54–6.47 (м, 1H), 5.81 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H), 5.55 (с, 2H), 4.79 (уш.с., 2H). ^{13}C ЯМР (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 147.2, 139.5, 136.9, 130.2, 127.8, 122.6, 122.5, 120.9, 120.7, 114.5, 113.4, 95.7, 44.8. Масс-спектр $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{S}$, m/z : рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306.9899, получено 306.9900.

Экспрессия и очистка ферментов. Сверхэкспрессию полноразмерных SaCSE (КФ 4.4.1.1 – цистатионин- γ -лиаза *Staphylococcus aureus*) и hCSE (КФ 4.4.4.1 – цистатионин- γ -лиаза человека) в клетках *Escherichia coli* проводили с использованием экспрессионных векторов, любезно предоставленных д-ром Е. Нудлером (Dr. Evgeny Nudler, Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, США), и по описанным ранее методикам [2]. Экспрессию гена, кодирующего CSE с тегом His₁₀-SUMO на N-конце, индуцировали 0.2 мМ

изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG), культуру выращивали в течение 5 ч при 37°C. Клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в буфере для лизиса, содержащем 20 мМ трис-HCl, pH 8.0, 0.5 М NaCl, 5 мМ имидазола, 5 мМ β-меркаптоэтанола (β-МЭ) и ингибитор протеазы фенолметилсульфонил фторид (PMSF) (“Sigma-Aldrich”), и обрабатывали ультразвуком. Полученный лизат осветляли центрифугированием. Супернатант наносили на колонку HisTrap FF объемом 5 мл (“GE Healthcare”, США), колонку промывали буфером для лизиса, а целевой белок элюировали тем же буфером с концентрацией имидазола 0.25 М. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и метку His₁₀-SUMO снимали рекомбинантной SUMO-протеазой ULP1, меченной His₆ (“Servicebio”, Китай), при 4°C в течение 14–16 ч. Реакционную смесь диализовали против буфера, содержащего 20 мМ трис-HCl, pH 8.0, 0.05 М NaCl, 5 мМ β-МЕ, после чего протеазу ULP1-His₆ и отщепленный тег His₁₀-SUMO удаляли методом аффинной хроматографии на колонке HisTrap FF. Полученные фракции CSE концентрировали и очищали гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 (“GE Healthcare”) в 20 мМ трис-HCl, pH 8.0, 0.1 М NaCl и 5 мМ β-МЕ и хранили при 4°C для немедленного использования. Для длительного хранения небольшие аликвоты белка замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

Определение аффинности связывания CSE с потенциальными ингибиторами. Константы диссоциации (K_d) комплексов SaCSE и hCSE с ингибиторами определяли методом изотермической калориметрии титрования (Isothermal Titration Calorimetry; ITC) с использованием MicroCal PEAQ-ITC (“Malvern Panalytical”, Великобритания), как описано ранее [4]. Эксперименты проводили при 25°C в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 100 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 20% глицерина. Аликвоты (2.5 мкл) исследуемых соединений (MNS1 и NL2) добавляли в калориметрическую ячейку объемом 200 мкл до получения полной изотермы связывания. Концентрацию CSE в калориметрической ячейке варьировали в пределах 10–25 мкМ, а концентрацию лигандов в титрующем шприце – от 100 до 250 мкМ. Теплоту разбавления определяли титрованием не содержащего фермент буфера раствором лиганда, после чего изотерму разбавления вычитали из изотермы связывания, а полученную кривую обрабатывали и анализировали с помощью программного пакета MicroCal PEAQ-ITC с использованием модели одного типа сайтов связывания.

Определение минимальной концентрации гентамицина, ингибирующей рост клеток *B. subtilis*. Стандартизированные минимальные ингибирующие концентрации (МИК) определяли методом микроразведений, в соответствии с рекомендациями Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) [5]. Готовили серийные двукратные разведения

анализируемого антибиотика в 100 мкл лизогенной среды (LB; “Sigma-Aldrich”) с добавлением тестируемого CSE в концентрации 50 мкМ. Инокулят *B. subtilis* готовили в объеме 100 мкл LB в разведении 1.0×10^6 КОЕ/мл. За МИК принимали самую низкую концентрацию антибиотика, предотвращающую помутнение инокулята после 24 ч инкубации при 37°C. В последующих экспериментах использовали гентамицин в концентрации 0.1 мкг/мл (10% МИК).

Анализ гентамицинпотенцирующей активности MNS1 и NL2 на клетках *B. subtilis*. Кривые роста *B. subtilis* получали с помощью автоматизированной системы анализа роста Bioscreen C (“Oy Growth Curves Ab Ltd.”, Финляндия). Клетки *B. subtilis* 168 растили в среде LB при 37°C в течение ночи, разбавляли свежей средой (1 : 100), содержащей антибиотик и исследуемое соединение, как описано в тексте и в подписях к рисункам. По 150 мкл каждой смеси вносили в лунки в трех повторах и инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании. Значения оптической плотности при длине волны 600 нм (OD_{600}) регистрировали автоматически в течение 24 ч.

На временных графиках роста бактериальных клеток результаты представлены как средние, рассчитанные на основании трех независимых экспериментов.

Анализ генерации сероводорода клетками *B. subtilis*. Мониторинг продукции H₂S клетками *B. subtilis* проводили по описанной ранее методике – с использованием ацетата свинца в качестве детектора [6]. К внутренней стенке культурального флакона, выше уровня жидкой культуры бактерий, прикрепляли бумажные полоски, пропитанные 2%-ным водным раствором Pb(OAc)₂. Ночные культуры разбавляли средой LB (1 : 50) и инкубировали в течение 16–18 ч при 37°C с аэрацией. Концентрация анализируемых соединений (MNS1 и NL2) составляла 32 мкМ, в качестве отрицательного контроля использовали среду LB без добавок. Окрашенные бумажные полоски сканировали с помощью гель-документирующей системы AlphaImager (“BioTechne”, США). Результаты нормализовали на оптическую плотность культуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В продолжении работ группы Е. Нудлера [2] нами недавно разработаны и реализованы методики синтеза в граммовых количествах основных наиболее активных ингибиторов SaCSE: NL1, NL2, NL3 [7, 8]. В ходе проведенных биологических испытаний авторы обнаружили, что наиболее активным ингибитором SaCSE в этом ряду было соединение NL2 – 5-[(6-бром-1*H*-индол-1-ил)метил]-2-метилфуран-3-карбоновая кислота [2]. Перспективным

представляется получение аналога NL2 с тиофеновым заместителем вместо фуранового цикла. В результате нами был синтезирован и протестирован в роли ингибитора SaCSE вариант тиофенсодержащего производного, названный MNS1.

Синтез MNS1

Для синтеза потенциального ингибитора CSE был разработан новый путь: по линейной схеме с использованием в качестве ключевого соединения метил-3-аминотиофен-2-карбоксилата (**1**), синтезированного нами по описанной ранее методике [9] из хлоракрилонитрила и этилового эфира тиогликолевой кислоты (рис. 1). Для предотвращения в ходе дальнейшего синтеза возможных побочных процессов, из-за наличия в структуре соединения **1** реакционноспособной NH₂-группы, возникла необходимость выбора подходящей защитной группы. Благодаря относительно высокой стабильности, а также простоте в постановке и последующем снятии, в качестве такой группы было решено использовать *tert*-бутоксикарбонильную (Boc). Реакцию проводили в стандартных условиях: под действием Boc₂O в присутствии 4-диметиламинопиридина (DMAP) в качестве основания; в результате получали 3-[(*tert*-бутоксикарбонил)амино]тиофен-2-карбоксилат (**2**).

Полученный Boc-защищенный аминотиофен **2** вводили в реакцию α-литирования диизопропиламидом лития (LDA), с последующим формилированием полученного соединения **3**.

(5-Бромметил)-3-[(*tert*-бутоксикарбонил)амино]тиофен-2-карбоксилат (**5**), необходимый для алкилирования 6-броминдола, получали по классической двухстадийной схеме, включающей восстановление альдегидной группы в соединении **3** боргидридом натрия и обмен гидроксильной группы промежуточного спирта **4** на бром по реакции Аппеля. Далее при сочетании полученного бромида **5** с 6-броминдолом в присутствии гидроксида натрия в качестве основания был получен ключевой предшественник целевого аминотиофена – соединение **6**.

Аминотиофен **7** был получен в результате двухстадийного процесса, включающего щелочной гидролиз сложноэфирной группы с промежуточным образованием натриевой соли карбоновой кислоты, которая при последующем подкислении реакционной массы водным раствором HCl сначала превращается в соответствующую кислоту, а затем немедленно декарбоксилируется. Одновременно с этим происходит катализируемое кислотой снятие Boc-защиты с образованием целевого соединения **7** в виде гидрохлорида (рис. 1).

Взаимодействие MNS1 с SaCSE и hCSE

Финальный продукт **7** (MNS1) анализировали как потенциальный ингибитор ферментативной активности CSE. Так, определены значения констант диссоциации (K_d) для комплексов бактериальной CSE (SaCSE) и CSE человека (hCSE) с соединением MNS1 и NL2 – наиболее эффективным

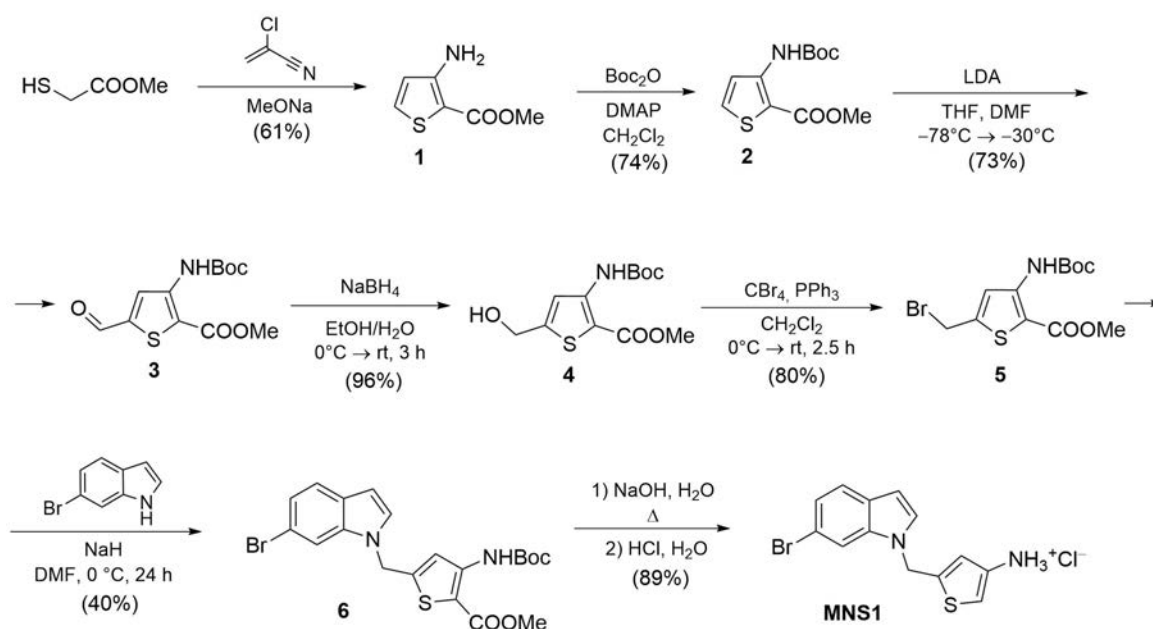


Рис. 1. Схема синтеза гидрохлорида 3-амино-5-[(6-бром-1*H*-индол-1-ил)метил]тиофена (MNS1). Обозначения: MeONa — метилат натрия, Boc — *tert*-бутилоксикарбонил, DMAP — 4-диметиламинопиридин, DMF — диметилформамид, LDA — диизопропиламид лития, THF — тетрагидрофуран, rt — комнатная температура, Δ — кипячение.

ингибитором *Sa*CSE, выявленным ранее [2]. Как видно из результатов, представленных в табл. 1, аффинность MNS1 к *Sa*CSE практически в два раза выше, чем к NL2. Индекс селективности (SI) связывания MNS1 с hCSE и *Sa*CSE (определяемый как отношение значений K_d для этих комплексов) составлял 19.7, в то время как в случае NL2-14.1. Таким образом, соединение MNS1 по селективности действия в отношении *Sa*CSE превосходит NL2. Следовательно, в случае применения MNS1 в качестве антибактериального средства его потенциально негативное действие, обусловленное нарушением hCSE-зависимого биосинтеза цистеина в организме человека, будет менее вероятно, чем для NL2.

Таблица 1. Константы диссоциации (K_d) комплексов *Sa*CSE и hCSE с MNS1 и NL2, определенные методом изотермической калориметрии титрования (ICT)

Фермент	Соединение	K_d , мкМ
<i>Sa</i> CSE	MNS1	0.59 ± 0.04
	NL2	1.09 ± 0.04
hCSE	MNS1	11.6 ± 0.1
	NL2	15.4 ± 2.7

Оценка эффективности MNS1 в роли потенциатора гентамицина в отношении *B. subtilis*

Ингибирующую активность соединения MNS1 анализировали на культуре клеток *B. subtilis* 168. Этот микроорганизм был выбран нами на основании данных о высокой гомологии строения активного центра *Sa*CSE среди различных видов бактерий [10]. В качестве положительного контроля использовали описанный ранее CSE-ингибитор NL2 [2]. Потенцирующее действие исследуемых ингибиторов оценивали с помощью стандартного анализа МИК. В ходе экспериментов были определены минимальные концентрации NL2 и MNS1, оказывающие максимальный потенцирующий эффект в присутствии гентамицина в концентрации 0.1 мкг/мл (10% МИК). Вещества не обладают токсическим действием на клетки *B. subtilis* в используемом диапазоне концентраций. Синтезированное нами соединение MNS1 обладает более выраженным потенцирующим действием в сравнении с NL2 при используемой концентрации 50 мкМ (рис. 2). В отличие от NL2, в экспериментах с MNS1 не наблюдалось возобновления роста культуры клеток по прошествии 10 ч инкубации (рис. 2a). Кроме того, соединение

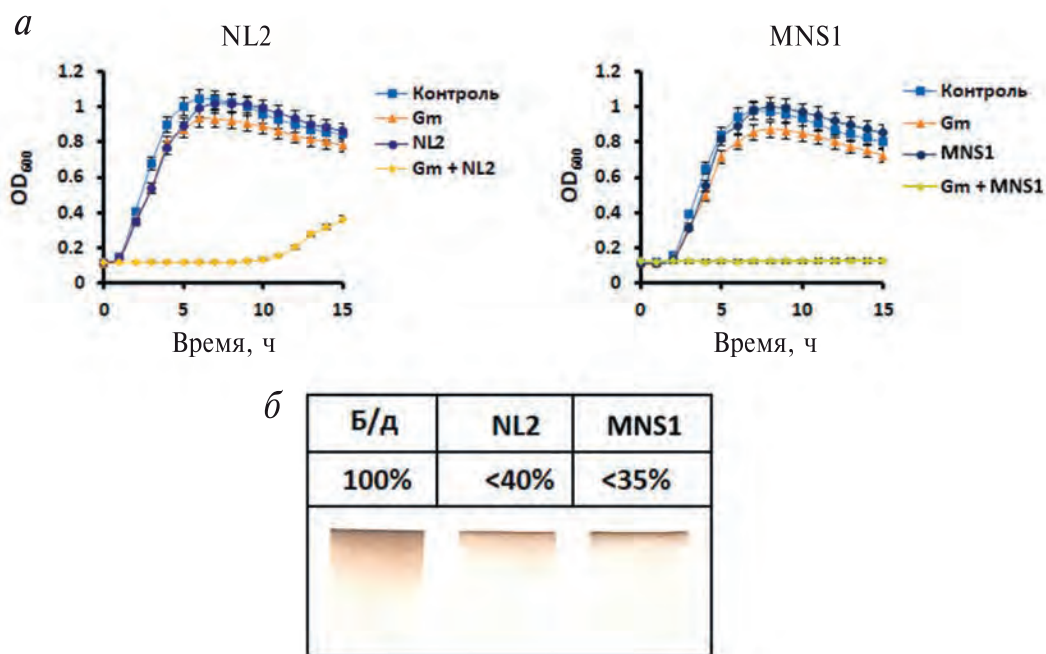


Рис. 2. Сравнительный анализ NL2 и MNS1 как потенциаторов гентамицина в отношении штамма *B. subtilis* 168. *а* – Репрезентативные кривые роста штамма *B. subtilis* 168 в присутствии 0.1 мкг/мл гентамицина (Gm), а также 50 мкМ NL2 или MNS1. Клетки растили при 37°C с аэрацией в автоматизированной системе анализа роста Bioscreen C. Результаты представлены как средние значения \pm стандартное отклонение, рассчитанные на основании трех повторов в одном эксперименте. *б* – Анализ генерации H_2S клетками *B. subtilis* 168 в присутствии NL2 и MNS1. На пропитанных 2%-ным раствором ацетата свинца полосках фильтровальной бумаги появляется коричневое окрашивание, вызванное образованием соли PbS в результате испарения H_2S бактериальной суспензией. Цифрами указаны изменения в продукции H_2S относительно контрольных клеток.

MNS1 более эффективно подавляло генерацию сероводорода клетками *B. subtilis* (рис. 2б).

Бактериальная цистатионин- γ -лиаза — ключевой фермент метаболизма H_2S , один из основных кандидатов-мишеней для поиска ингибиторов с целью создания комбинированной терапии “антибиотик + потенциатор”. Нами разработан метод синтеза соединения индольного ряда — 3-амино-5-[(6-бром-1*H*-индол-1-ил)метил]тиофена (MNS1)-, и продемонстрирован его потенциал как ингибитора H_2S -генерирующей активности бактерий на примере *B. subtilis*. Показано, что MNS1 эффективнее связывается бактериальным ферментом SaCSE (из *S. aureus*), чем присущим человеку (hCSE), и по селективности (SaCSE/hCSE) превосходит ранее описанные ингибиторы NL1–NL3. Кроме того, продемонстрировано, что MNS1 усиливает антибактериальное действие гентамицина на клетки *B. subtilis*. Таким образом, синтезированное нами соединение MNS1 может стать основой для дизайна новых потенциаторов антибиотиков для подавления роста бактериальных клеток, экспрессирующих CSE.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (контракт в системе “Электронный бюджет” № 075-10-2021-113, ID проекта: RF----193021X0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller W.R., Arias C.A. (2024) ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat. Rev. Microbiol.* **22**(10), 598–616. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w>
2. Shatalin K., Nuthanakanti A., Kaushik A., Shishov D., Peselis A., Shamovsky I., Pani B., Lechpammer M., Vasilyev N., Shatalina A., Rebatchouk D., Mironov A., Fedichev P., Serganov A., Nudler E. (2021) Inhibitors of bacterial H_2S biogenesis targeting antibiotic resistance and tolerance. *Science*. **372**, 1169–1175.
3. Solyev P.N., Isakova E.B., Olsufyeva E.N. (2023) Antibacterial conjugates of kanamycin A with vancomycin and eremomycin: biological activity and a new MS-fragmentation pattern of Cbz-protected amines. *Antibiotics*. **12**, 894.
4. Mariasina S.S., Chang C.F., Petrova O.A., Efimov S.V., Klochkov V.V., Kechko O.I., Mitkevich V.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Polshakov V.I. (2020) Williams–Beuren syndrome-related methyltransferase WBSCR27: cofactor binding and cleavage. *FEBS J.* **287**, 5375–5393.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015) *Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard*, 10th edition. CLSI document M07–A10. National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Wayne PA.
6. Forbes B.A. (1998) *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th edition. St. Louis, MO: Mosby, 1069 p.
7. Potapov K.V., Novikov R.A., Novikov M.A., Solyev P.N., Tomilov Y.V., Kochetkov S.N., Makarov A.A., Mitkevich V.A. (2023) Synthesis of the indole-based inhibitors of bacterial cystathionine γ -lyase NL1–NL3. *Molecules*. **28**, 3568.
8. Novikov M.A., Potapov K.V., Novikov R.A., Solyev P.N., Tomilov Y.V., Kochetkov S.N., Makarov A.A., Mitkevich V.A. (2024) A convenient synthesis of a chlorobenzothiophenyl-indole-based inhibitor of bacterial cystathionine γ -lyase. *Mendeleev Commun.* **34**, 255–258.
9. Huddleston P. R., Barker J. M. (1979) A convenient synthesis of 2-substituted 3-hydroxy- and 3-aminothiophens from derivatives of 2-chloroacrylic acid. *Synthetic Commun.* **9**, 731–734.
10. Pedretti M., Fernández-Rodríguez C., Conter C., Oyenarte I., Favretto F., di Matteo A., Dominici P., Petrosino M., Martinez-Chantar M.L., Majtan T., Astegno A., Martínez-Cruz L.A. (2024) Catalytic specificity and crystal structure of cystathionine γ -lyase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **14**, 9364.

Development of a New Inhibitor of Bacterial Cystathionine γ -Lyase Based on 6-Bromoindole and Amino thiophene

R. A. Novikov^{1, 2}, D. N. Platonov², A. Yu. Belyy², K. V. Potapov^{1, 2},
M. A. Novikov^{1, 2}, Yu. V. Tomilov², O. I. Kechko¹,
T. A. Seregina¹, P. N. Solyev^{1, *}, V. A. Mitkevich¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: solyev@gmail.com

Cystathionine γ -lyase (CSE) is a key enzyme for the H_2S generation in such pathogenic bacteria as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. Suppression of CSE activity significantly increases the sensitivity of bacteria to the action of antibiotics. Here, we present a method for the synthesis of a novel indole-based

CSE inhibitor, 3-amino-5-[(6-bromo-1*H*-indol-1-yl)methyl]thiophene, named MNS1. The synthesis of this compound is based on the modification of substituted thiophene as the main structural fragment, which is involved the alkylation of 6-bromoindole at the final stages. The dissociation constant of the MNS1 complex with bacterial CSE (from *S. aureus*, SaCSE) was 0.5 μM , which was an order of magnitude lower than that for human CSE (hCSE). The MNS1 compound was shown to effectively enhance the antibacterial effect of gentamicin against *Bacillus subtilis*, allowing it to be used as an antibiotic potentiator, to inhibit the growth of CSE-expressing bacterial cells.

Keywords: cystathionine γ -lyase, SaCSE, indole compounds, antibiotic potentiator, gentamicin, *Bacillus subtilis*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИЗОЛЯТА ССГС 19/16 КАК *Bacillus cytotoxicus*

© 2024 г. Н. Б. Поляков^{a, b}, Д. С. Карпов^c, М. В. Зубашева^{a, *},
А. Н. Полякова^d, Д. Н. Щербинин^a, А. И. Соловьев^a, М. В. Лаврентьев^a,
Т. А. Смирнова^a, М. А. Сухина^e, В. Г. Жуховицкий^{a, f}

^aНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия

^bИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского
Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^cЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^dФакультет почвоведения Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^eНациональный медицинский исследовательский центр колопроктологии
им. А.Н. Рыжих Минздрава России, Москва, 123423 Россия

^fРоссийская медицинская академия непрерывного профессионального образования
(РМАНПО) Минздрава России, Москва, 125993 Россия

*e-mail: mzubasheva@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

После доработки 23.04.2024 г.

Принята к публикации 20.05.2024 г.

Bacillus cereus sensu lato (*s.l.*) объединяет такие генетически, морфологически и физиологически близкие виды грамположительных спорообразующих бактерий с высоким патогенным потенциалом, как, например, *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Токсин-продуцирующие штаммы *B. cereus s.l.* представляют большую опасность для здоровья человека. Высокая степень сходства видов, входящих в этот комплекс, сильно затрудняет их идентификацию и быстрое принятие адекватных мер при вызываемых ими заболеваниях. Ранее мы охарактеризовали клинический изолят ССГС 19/16, принадлежащий *B. cereus s.l.*, который имел черты как *B. cereus*, так и *B. cytotoxicus*. В настоящей работе с помощью мультилокусного типирования последовательностей (MLST) и масс-спектрометрического анализа изолят ССГС 19/16 идентифицирован как *B. cytotoxicus*. Показано также, что штамм ССГС 19/16, в отличие от других представителей вида *B. cytotoxicus*, не обладает термотолерантностью, а от *B. cereus* этот штамм отличает чувствительность к большинству антибиотиков и повышенная подвижность. Как и *B. cereus*, штамм ССГС 19/16 формирует зоны β-гемолиза в кровяном агаре. Кроме того, длительное хранение образцов перед анализом может привести к неверной идентификации изолята. Полученные нами результаты указывают на то, что “быстрые методы” анализа, использующие единичные гены, имеют недостаточную разрешающую силу в идентификации видов *B. cereus s.l.* Достаточную разрешающую силу дает сочетание MLST-анализа с MALDI-TOF MS.

Ключевые слова: *Bacillus cereus sensu lato*, *Bacillus cytotoxicus*, масс-спектрометрия, MLST

DOI: 10.31857/S0026898424060099, **EDN:** IASZNL

ВВЕДЕНИЕ

В группу *Bacillus cereus sensu lato* (или *Bacillus cereus group*) входят генетически, морфологически и физиологически сходные грамположительные спорообразующие бактерии с низким GC-составом генома, потенциально обладающие высокой патогенной активностью в отношении животных и человека [1]. Представители этой группы часто встречаются в окружающей среде. Термостабильность и устойчивость спор к ультрафиолетовому излучению и бактерицидным средствам способствуют попаданию этих бактерий на продукты питания и медицинское оборудование. Это может приводить к развитию пищевых токсикоинфекций и таких тяжелых заболеваний, как пневмония [2], менингит [3], сепсис [4] и бактериемия [5].

Количество видов спорообразующих бактерий, выделяемых из природных источников, растет. Увеличивается и число близкородственных видов в составе *B. cereus s.l.* — в 2013 г. их было 7 [6], в 2015–11 [7], в 2017 г., благодаря широкому использованию методов полногеномного секвенирования, число видов резко возросло до 21 [1], к 2022 г. составило 23 [8], а в настоящее время в Международной таксономической базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) [9] представлено 27 видов. Согласно NCBI, к *B. cereus s.l.* относятся: *B. albus*, *B. anthracis*, *B. bombysepticus*, *B. cereus*, *B. clarus*, *B. cytotoxicus*, *B. gaemokensis*, *B. hominis*, *B. luti*, *B. manliponensis*, *B. mobilis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. nitratireducens*, *B. pacificus*, *B. paramobilis*, *B. paramycoides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus*, *B. pseudomycoides*, *B. samanii*, *B. sanguinis*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. tropicus*, *B. wiedmannii*. Однако NCBI, как указано на странице этой базы, не является авторитетным источником по номенклатуре и классификации видов, но при этом может служить полезным источником данных для соответствующих исследований.

Стремительный рост числа видов, входящих в комплекс *B. cereus s.l.*, диктует необходимость совершенствования способов быстрой идентификации и внутригрупповой дискриминации клинических изолятов для назначения адекватной терапии заболеваний, связанных с ними. В качестве методов быстрой и относительно точной идентификации штаммов *B. cereus s.l.* ранее были предложены методы на основе секвенирования 16S рДНК [10], отдельных генов [11] или наборов генов [12], включая мультилокусное типирование последовательностей (MLST), а также времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией и ионизацией (MALDI-TOF) [13].

B. cytotoxicus включен в состав *B. cereus s.l.* в 2013 г. на основании сходства нуклеотидной последовательности 16S РНК и данным MLST [6]. Представители вида характеризуются термотолерантностью и способностью сохранять жизнеспособность при 50°C [14].

В настоящей работе с использованием методов MLST и масс-спектрометрии выделенный ранее клинический изолят ССGC19/16 (SRCC19/16) идентифицирован как *B. cytotoxicus*, показано также нетипичное для *B. cytotoxicus* отсутствие термотолерантности у этого изолята.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. В экспериментах использовали два эталонных штамма: *B. cereus* ATCC 10702 и *B. cereus* ATCC10876, два клинических изолята, обозначенных как ССGC19/16 и ССGC1208, выделенных из фекалий пациента с язвенным колитом. Клинические изоляты любезно предоставлены ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А. Н. Рыжих” Минздрава России. Штаммы культивировали на плотной питательной среде NBY (питательный бульон (8 г/л), дрожжевой экстракт (2 г/л), агар (15 г/л) (“Difco”, США) при 37°C в течение 12–96 ч.

Идентификация штаммов *B. cereus* с помощью MLST. ДНК выделяли с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (“Promega”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Фрагменты ДНК амплифицировали с помощью ScreenMix (“Евроген”, Россия). Использованные в работе праймеры перечислены в табл. 1. Условия ПЦР были следующими: денатурация при 95°C в течение 3 мин; затем 35 циклов — 95°C (30 с), 60°C (30 с) и 72°C (90 с); финальный этап элонгации — 72°C (5 мин). Продукты ПЦР очищали с помощью набора GeneJet PCR purification kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) и секвенировали по методу Сэнгера с использованием обоих праймеров. Последовательно секвенированных фрагментов генов *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pusA* и *trpI* объединяли в единую химерную последовательность общей длиной 2952 п.н., которую использовали в поиске в коллекции невырожденных последовательностей базы данных NCBI с использованием алгоритма MegaBlast ([15], <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с параметрами, установленными по умолчанию. Далее строили филогенетическое древо на основе парного выравнивания BLAST с использованием метода Fast-Minimum Evolution. Полученные последовательности анализировали также путем сравнения с аллелями из баз данных pubMLST ([16], <https://pubmlst.org/organisms/bacillus-cereus> доступ 31 июля 2023 г) и fIDBAC [17].

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в MLST-анализе

Ген	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Источ- ник
<i>glpF</i>	GCGTTTGTGCTGGTGTAAAGT CTGCAATCGGAAGGAAGAAG	[16]
<i>gmk</i>	GAGAAGTAGAAGAGGATTGTCATC GCAATGTTCCCAACCACAA	[16]
<i>ilvD</i>	AGATCGTATTACTGCTACGG GTTACCATTGTGCATAACGC	[16]
<i>pta</i>	GCAGAGCGTTTAGCAAAAGAA TGCAATGCGAGTTGCTTCTA	[16]
<i>pur</i>	CTGCTGCGAAAAATCACA CTCACGATTGCTGCAATAA	[16]
<i>pycA</i>	GCGTTAGGTGGAACGAAAG CGCGTCCAAGTTTATGGAAT	[16]
<i>tpi</i>	GCCCAGTAGCACTTAGCGAC CCGAAACCGTCAAGAATGAT	[16]

Получение спор бацилл и оценка их жизнеспособности. Культуры штаммов рассеивали на плотную питательную среду NBY и инкубировали при 37°C в течение 120 ч. Образование спор контролировали с помощью фазово-контрастной микроскопии. Материал смывали с агара, промывали трижды в дистиллированной воде с последующим центрифугированием при 9000 об/мин в течение 5 мин. Промытый препарат спор прогревали при 75°C в течение 30 мин. Концентрацию жизнеспособных спор в полученных препаратах определяли путем посева 0.1 мл серии десятикратных разведений образца на питательный агар и подсчета выросших колоний через 24 ч инкубации при 37°C.

Определение термоустойчивости спор бацилл. Термоустойчивость спор бацилл определяли как описано ранее с небольшими модификациями [18]. В экспериментах использовали водные суспензии спор объемом 1.5 мл (10^7 – 10^8 жизнеспособных спор/мл). Споры ресуспендировали в дистиллированной воде вместо фосфатного буфера, чтобы исключить возможное влияние солей на прорастание спор. Суспензии спор помещали в тонкостенные пластиковые криопробирки диаметром 10 мм и высотой 40 мм с завинчивающимися крышками. Пробирки помещали в циркуляционную водяную баню, нагретую до 100°C. Пробирки извлекали из бани через 0, 2, 4, 6, 8 и 10 мин и охлаждали в ледяной бане в течение 5–10 мин. Из охлажденных пробирок отбирали аликвоты по 0.1 мл каждого образца и определяли количество жизнеспособных спор путем выращивания серии разведений на среде NBY как описано выше. Все эксперименты выполняли в трех независимых

биологических повторах. Термоустойчивость спор оценивали также величиной D_{100} , которую выражали в минутах, требующихся для десятикратного снижения числа колониеобразующих единиц при воздействии температуры 100°C. Значения D_{100} вычисляли по уравнениям прямых, аппроксимирующих кривые выживаемости спор, построенных методом наименьших квадратов. Расчеты производили в онлайн программе МНК (<https://метод-наименьших-квадратов.рф> доступ 18 июля 2023 г).

Масс-спектрометрия MALDI-TOF. Белки и пептиды экстрагировали, как описано Sauer и соавт. [19], с незначительными модификациями. Биомассу микроорганизмов собирали пластиковой микробиологической петлей объемом 1 мкл и ресуспендировали в 300 мкл деионизированной воды. К суспензии добавляли 900 мкл 96%-ного этанола, полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 18894 g в течение 2 мин. К осадку, высушенному на воздухе, добавляли от 5 до 40 мкл 70%-ной муравьиной кислоты (в зависимости от объема осадка) и равный объем ацетонитрила. Полученную смесь центрифугировали при 18894 g в течение 2 мин. Супернатант, содержащий белковый экстракт, использовали в масс-спектрометрическом анализе.

На 384-луночную стальную мишень (“Bruker Daltonics”, Германия) наносили 1 мкл супернатанта и высушивали при комнатной температуре. На поверхность высушенного экстракта наносили 1 мкл раствора матрицы: насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (“Sigma Aldrich”, США), содержащий 50% ацетонитрила и 2.5% трифторуксусной кислоты (“Panreac”, США), который также высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе UltrafleXtreme (“Bruker daltonics”), оснащенном Nd: Yag-лазером (355 нм) в линейном режиме. Детектировали положительно заряженные ионы в диапазоне m/z от 2000 до 20000. при следующих настройках ионного источника: напряжение на IS1 20 кВ, на IS2 19 кВ, на линзах (параметр “Lens”) 4.5 кВ, напряжение питания детектора 2885 В, коэффициент усиления 12.6.

Спектры снимали в автоматическом режиме с использованием программы Flex Control (v.3.4, build 135). Точки обстрела лазером на мишени выбирали случайным образом. Суммировали 1200 спектров с 200 точек обстрела лазером с частотой 2 кГц.

Библиотеки спектров каждого образца получали при анализе триплекатов восьми технических повторов. Калибровочным стандартом и положи-

тельным контролем служил белковый экстракт *Escherichia coli* DH5 α с дополнительными белками (РНКаза А [M+H]⁺ 13683.2 Да, миоглобин [M+H]⁺ 16952.3 Да) (кат. номер 255343, “Bruker Daltonics”).

Полученные спектры обрабатывали с помощью программного комплекса MALDI biotyper Compass Explorer 4.1 (“Bruker Daltonics”) с использованием стандартного метода препроцессинга данных (Biotyper Preprocessing Standard Method). Обработанные спектры образцов сравнивали с референсной базой характеристических спектральных профилей, включающей 6905 записей. Результаты поиска характеристического профиля выражали как логарифм значений. Значения ниже 1.699 соответствовали ненадежному определению рода; 1.700–1.999 – надежному определению рода и, возможно, вида; 2.000–2.299 – надежному определению рода и с высокой вероятностью вида и, наконец, значения 2.300–3.000 соответствовали надежной идентификации до вида.

Дендрограммы составляли с помощью программного обеспечения MALDI-biotyper Compass Explorer 4.1 (“Bruker Daltonics”); дополнительный анализ масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения ClinProTools 3.0 (“Bruker Daltonics”).

Оценка чувствительности бактериальных штаммов к антибиотикам. Чувствительность штаммов к панели антибиотиков оценивали стандартным диско-диффузионным методом. На поверхности чашек Петри, заполненных агаризованной средой Мюллера–Хинтона № 2 (“Becton Dickinson”, США), равномерно распределяли суспензию клеток (10⁶ КОЕ/мл). Через 15 мин в центр накладывали бумажные диски диаметром 6 мм, пропитанные стандартными концентрациями антибиотиков (MASTDISCS®AST, Германия). Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 ч, после чего определяли диаметр зоны ингибирования роста. Полученные данные интерпретировали в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам (EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 14.0, https://www.eucast.org/clinical_breakpoints, доступ 11 апреля, 2024 г).

Оценка подвижности бактерий. Культуру бактерий в капле объемом 5 мкл нанесли на центр чашки Петри, заполненной специализированной агаризованной средой (Motility test medium, “Becton Dickinson”). Чашки инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Каждые 24 ч измеряли диаметр колоний.

Оценка зон гемолиза. Культуры бактерий наносили штрихом на поверхность чашек Петри с колумбийским агаром с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови (ООО “ГЕМ”,

Россия). Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 24 ч и фотографировали в проходящем свете для визуализации зон лизиса кровяного агара. Результаты интерпретировали в соответствии со стандартными рекомендациями (<https://asm.org/protocols/blood-agar-plates-and-hemolysis-protocols>, доступ 11 апреля, 2024 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация CCGC19/16 с помощью MALDI-TOF MS-анализа

Ранее мы установили, что клинический изолят CCGC19/16 имеет характеристики как *B. cereus*, так и близкого вида *B. cytotoxicus*, который входит в *B. cereus s.l.* [20]. Первичная идентификация клинических изолятов с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF проведена с использованием базы референсных спектров более старой версии 29 (MALDI biotyper Compass Explorer 4.1 (version 29)). Полученные результаты указывали лишь на то, что изолят относится к роду *Bacillus* [20]. Повторный спектрометрический анализ провели с использованием обновленной спектральной базы версии 30. Согласно полученным данным (табл. 2), клинический изолят с более высокой степенью надежности относится к виду *B. cytotoxicus*. Результаты идентификации других штаммов не изменились качественно, незначительно изменились количественные характеристики надежности идентификации. Таким образом, в идентификации бацилл следует использовать наиболее поздние версии базы данных референсных пиков.

Таблица 2. Результат идентификации клинических изолятов методом MALDI-TOF MS

Штамм	Наиболее близкий штамм	Надежность идентификации ^a
Клинический изолят CCGC 19/16	<i>B. cytotoxicus</i> 1Z46778_1e MVD	2.26
Клинический изолят CCGC 1208	<i>B. cereus</i> DSM 31T DSM	2.09
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>B. cereus</i> 4080 LBK	2.23
<i>B. cereus</i> NCTC 8035	<i>B. cereus</i> 4080 LBK	2.41

^aПриведено значение интегральной количественной оценки надежности идентификации штамма (см. раздел “Экспериментальная часть”).

Влияние длительности инкубации культур
бацилл на их идентификацию с помощью
MALDI-TOF MS

Ранее было показано, что на MALDI-TOF MS-спектры микроорганизмов рода *Bacillus* и, следовательно, на их идентификацию сильно влияют условия культивирования бактерий, которые, в свою очередь, влияют на процесс формирования спор [21]. Нами проведен масс-спектрометрический анализ штаммов, выращенных в питательной среде одного состава, при одинаковой температуре в течение 4 суток. Согласно полученным результатам (рис. 1), изоляты CCGC19/16 ближе к видам *B. cytotoxicus* на 12, 24, 48 и 96 ч инкубации. Однако во временной точке 72 ч CCGC19/16 ближе к штаммам *B. cereus*. Можно отметить также, что другие штаммы *B. cytotoxicus* образуют обособленную группу лишь на 12 ч инкубации, но в более поздних временных точках некоторые штаммы сближаются со штаммами *B. cereus*. Эти результаты указывают на то, что ошибка в идентификации клинических изолятов бацилл может быть связана с их длительной инкубацией перед проведением анализа.

Идентификация изолята CCGC19/16
с использованием MLST-анализа

MALDI-TOF MS позволяет быстро определить род бактериальных изолятов. Видовая принадлежность изолятов нуждается в уточнении другими методами. Кроме того, как показано ранее [20], результаты MALDI-TOF MS-анализа представителей рода *Bacillus* сильно зависят от условий их культивирования. На следующем этапе использовали генетический способ идентификации клинического изолята с помощью MLST. В MLST-схемах идентификации штаммов в группе *B. cereus* используют фрагменты семи генов домашнего хозяйства: *glpF* (обеспечивает импорт глицерина), *gmk* (предполагаемая гуанилаткиназа), *ilvD* (дегидратаза дигидроксикислот), *pta* (фосфат-ацетилтрансфераза), *pur* (фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид-формилтрансфераза), *pusA* (пируваткарбоксилаза) и *tpi* (триозофосфатизомераза) [16]. Характеристичные фрагменты генов *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pusA* и *tpi* амплифицировали и секвенировали с использованием праймеров (см. табл. 1). В ходе поиска в базах данных pubMLST и fDBAC установлено, что шесть из семи анализируемых фрагментов идентичны из-

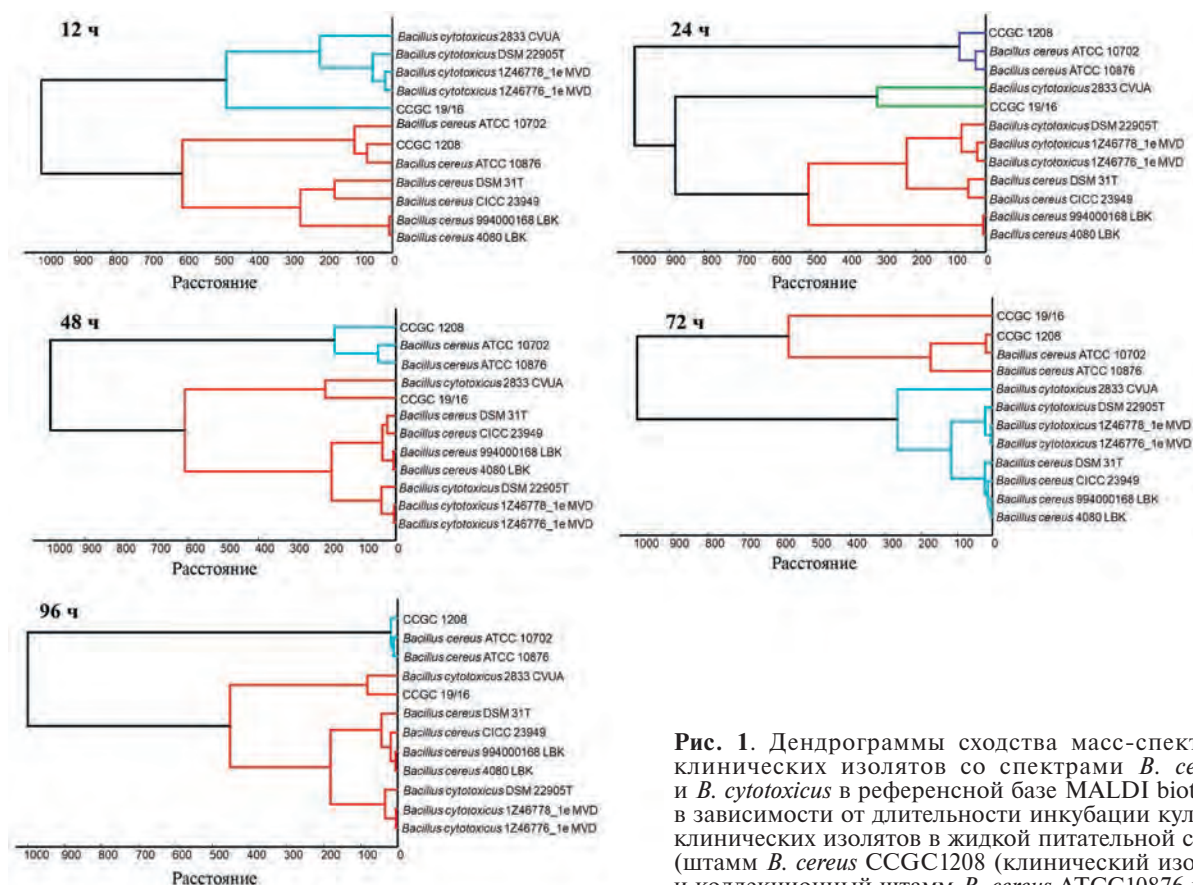


Рис. 1. Дендрограммы сходства масс-спектров клинических изолятов со спектрами *B. cereus* и *B. cytotoxicus* в референсной базе MALDI biotyper в зависимости от длительности инкубации культур клинических изолятов в жидкой питательной среде (штамм *B. cereus* CCGC1208 (клинический изолят) и коллекционный штамм *B. cereus* ATCC10876 подробно описаны ранее в работе [20]).

вестным аллелям: *glpF* — аллелю 211, *gmk* — 127, *ilvD* — 465, *pta* — 221, *pur* — 338, *pusA* — 266. Лишь для фрагмента гена *tpi* не удалось найти известного аллеля. В базе данных pubMLST эта комбинация наиболее близка к двум сиквенс-типам ST-2116 и ST-2121 (табл. 3), которые отличаются только локусом *ilv* и оба обнаружены только у *B. cytotoxicus*. Последовательность характеристического фрагмента гена *ilvD* отличается от аллеля 333 одним нуклеотидом — A135G, от аллеля 339 двумя — C12G и A24G. При этом фрагмент *tpi* отличается от аллеля 171 заменой одного нуклеотида — A117C. Следовательно, результаты MLST-анализа указывают на принадлежность штамма CCGC19/16 к виду *B. cytotoxicus*.

Чтобы учесть отличия в последовательности гена *tpi* при идентификации изолята CCGC19/16, в поиске сходных последовательностей по всей базе невырожденных нуклеотидных последовательностей NCBI с помощью BLAST использовали химерную последовательность, состоящую из характеристических сегментов генов *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pusA* и *tpi*. Наиболее близкие последовательности использовали для построения дерева сходства. Согласно полученным результатам,

наиболее близкими CCGC19/16 оказались штаммы вида *B. cytotoxicus* (табл. 4, рис. 2). Полученные данные подтверждают результаты MLST-анализа и свидетельствуют о том, что CCGC19/16 принадлежит к виду *B. cytotoxicus*.

Оценка термочувствительности спор CCGC19/16

Отличительной характеристикой представителей вида *B. cytotoxicus* служит их термотолерантность [14]. Однако, как обнаружено ранее, вегетативные клетки изолята CCGC19/16 этим свойством не обладают [20]. В данной работе нами проверена термоустойчивость спор CCGC19/16 (рис. 3). В качестве штаммов сравнения использовали референсные штаммы *B. cereus* ATCC10876 и ATCC 10702, а также клинический изолят CCGC1208, идентифицированный ранее как *B. cereus* [20]. Согласно полученным результатам (рис. 3а), кривая выживаемости спор изолята CCGC19/16 при 100°C незначительно отличается от кривых выживаемости референсного штамма *B. cereus* ATCC10876 и клинического изолята CCGC1208. Выраженную чувствительность к температу-

Таблица 3. Результаты MLST-анализа

Сиквенс-тип	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>Pta</i>	<i>pur</i>	<i>pusA</i>	<i>tpi</i>
ST-2116	211	127	339	221	338	266	171
ST-2121	211	127	333	221	338	266	171

Таблица 4. Результаты поиска штаммов с последовательностями, наиболее близкими к объединенной последовательности генов *glpF-gmk-ilvD-pta-pur-pusA-tpi*, в базе данных NCBI с помощью BLAST

Штамм	Общий балл ^а	Значение <i>E</i> ^б	Идентичность, %	Идентификатор NCBI
<i>B. cytotoxicus</i> CH_2	5440	0.0	99.64	CP024116.1
<i>B. cytotoxicus</i> CH_3	5442	то же	то же	CP024113.1
<i>B. cytotoxicus</i> CH_4	5442	“_”	“_”	CP024111.1
<i>B. cytotoxicus</i> CH_13	5448	“_”	“_”	CP024109.1
<i>B. cytotoxicus</i> CH_15	5442	“_”	“_”	CP024107.1
<i>B. cytotoxicus</i> CH_38	5442	“_”	“_”	CP024098.1
<i>B. cytotoxicus</i> CH_39	5442	“_”	“_”	CP024096.1
<i>B. cytotoxicus</i> SM2.8	5431	“_”	“_”	CP066179.1
<i>B. cytotoxicus</i> SM1.1	5431	“_”	“_”	CP066184.1
<i>B. cytotoxicus</i> PDT2.12	5442	“_”	“_”	CP066185.1

^аОбщий балл — сумма баллов выравнивания всех найденных сегментов одной и той же последовательности в базе данных, которые соответствуют последовательности, заданной в поиске (вычисляется по всем сегментам).

^бЗначение *E* описывает число совпадений с искомой последовательностью, которые можно “случайно” увидеть при поиске в базе данных определенного размера. Чем меньше значение этого параметра, тем выше вероятность того, что обнаруженное совпадение неслучайно.

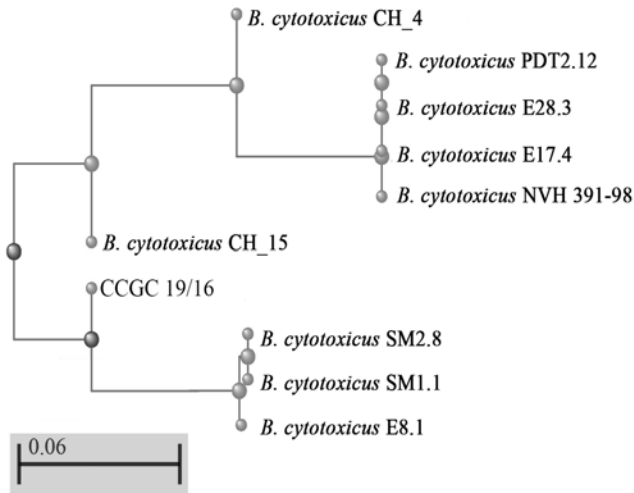


Рис. 2. Дерево сходства штаммов, построенное на основе попарных выравниваний результатов поиска объединенной последовательности генов *glpF-gmk-ihvD-pta-pur-русA-tri* в базе данных NCBI. Дерево построено с использованием метода Fast Minimum Evolution с параметрами по умолчанию.

ре проявляют споры референсного штамма *B. cereus* ATCC 10702. Полученные результаты подтверждаются данными по D100 (рис. 3б). Таким образом, изолят CCGC19/16 не обладает повышенной термоустойчивостью по сравнению с представителями вида *B. cereus*.

Профиль чувствительности CCGC19/16 к антибиотикам

Учитывая, что CCGC19/16 является клиническим изолятом, оценка профиля его устойчивости к различным группам антибиотиков представляет практический интерес. Чувствительность штамма CCGC19/16 к различным группам антибиотиков определили с использованием *B. cereus* ATCC 10702 в качестве штамма сравнения (табл. 5). Согласно полученным данным, штамм CCGC19/16 проявляет в целом большую чувствительность к антибиотикам, чем штамм *B. cereus* ATCC 10702. CCGC19/16 чувствителен ко всем группам антибиотиков, за исключением цефемов. *B. cereus* ATCC 10702 устойчив также к антибиотикам, относящимся к группам пенициллинов, цефалоспоринов, цефемов, макролидов, а также липопептидов. Полученные результаты указывают на то, что CCGC19/16 не относится к группе бактерий с множественной или широкой лекарственной устойчивостью.

Оценка подвижности и гемолиза у CCGC19/16

Следующим шагом стала оценка некоторых физиологических характеристик CCGC19/16, имеющих отношение к патогенезу, а именно, оценили подвижность клеток (рис. 4а, б) и степень гемолиза (рис. 5а, б). В качестве штамма сравнения использовали коллекционный штамм *B. cereus* ATCC 10702. Согласно полученным данным, клетки CCGC19/16, обладают большей подвижностью, чем *B. cereus* ATCC 10702. Через 24 ч роста CCGC19/16 формирует колонию со средним диаметром 28 мм (рис. 4а), через 48 ч средний диаметр колоний достигает 58 мм (рис. 4б), тогда как средний диаметр колоний *B. cereus* ATCC 10702 составляет 7 и 21 мм соответственно.

Вокруг колоний обоих штаммов формируются зоны β-гемолиза (рис. 5а,б). Полученные результаты указывают на наличие патогенного потенциала у CCGC19/16.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе с использованием комбинации методов MALDI-TOF MS и MLST клинический изолят CCGC19/16 идентифицирован как *B. cytotoxicus*. Показано, что CCGC19/16 не обладает термоустойчивостью, свойственной *B. cytotoxicus*.

Описаны разные подходы к быстрой идентификации штаммов *B. cereus* group по единичным генам, таким как *sspE* [22], *sph1* [23], *motB* [11, 24] и *spoIIAB* [25]. Использование этих подходов ранее привело к неверной идентификации изолята CCGC19/16 как *B. cereus* [20]. Следует отметить, что использовать единичные гены в качестве быстрых и удобных тестов рекомендовали в то время, когда количество штаммов рода *Bacillus* было относительно небольшим. В настоящее время валидированы уже более 420 видов рода *Bacillus* [26]. Очевидно, что в современных условиях точная идентификация бацилл по единичным генам невозможна.

MALDI-TOF MS-анализ позиционируется также как быстрый и надежный способ идентификации клинических изолятов бактерий [13]. Однако отметим, что в случае представителей рода *Bacillus* разрешающая способность этого метода ограничена из-за недостаточного количества референсных спектров представителей этого рода в базе данных. Более того, нами и другими авторами [21] показана возможность неверной идентификации близких видов из-за изменений условий культивирования. Это может быть связано с перестройками экспрессии генов и метаболизма клеток, ассоциированными с прохождением последовательных стадий процесса споруляции [27].

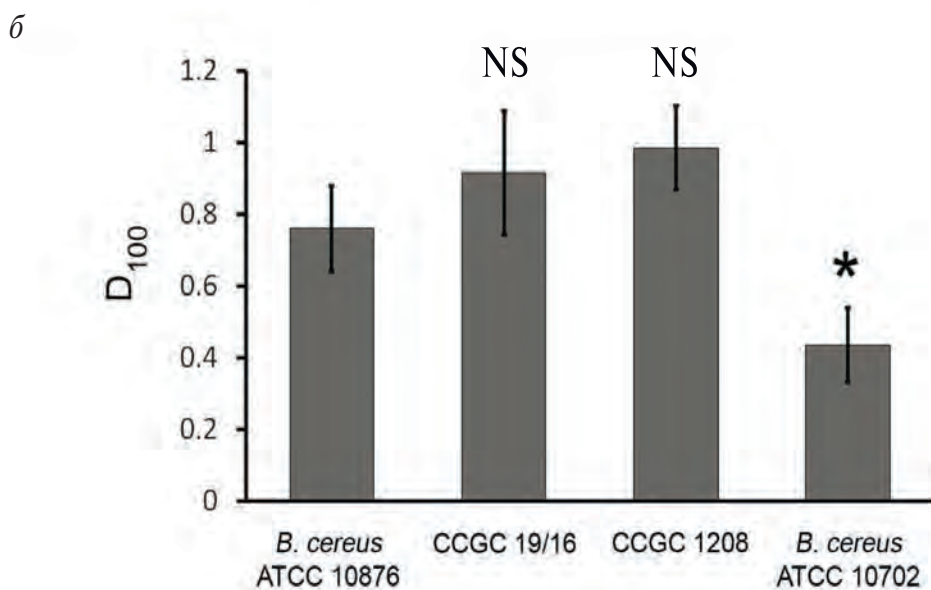
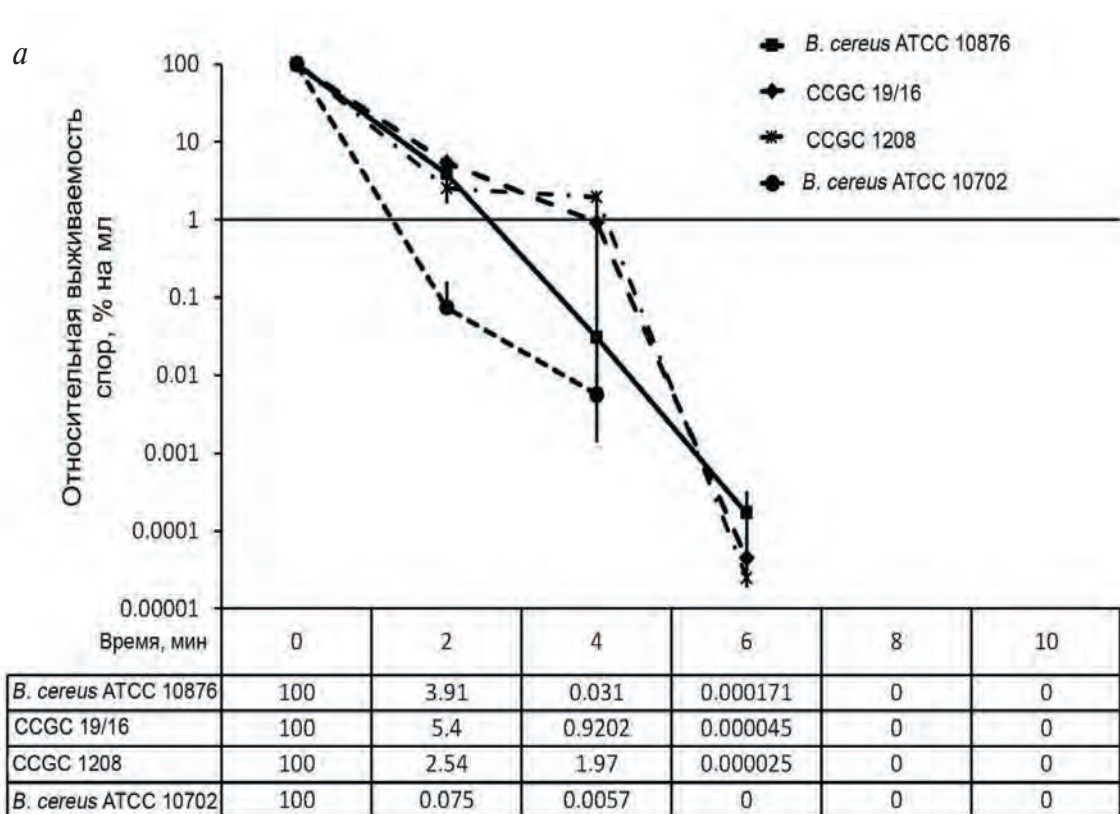


Рис. 3. Оценка термоустойчивости клинических изолятов и эталонных штаммов из группы *B. cereus*. *a* — Кривая относительной выживаемости спор. За 100% принято количество жизнеспособных спор в начальной точке. *б* — Значения D_{100} , вычисленные по данным, представленным на панели *a*. Значение D_{100} — время обработки спор (минуты) при 100°C, за которое количество жизнеспособных спор снижается в 10 раз. Разброс данных представлен стандартным отклонением для трех биологических повторов. Статистическая значимость: NS — незначимое отличие, * $0.05 > p > 0.01$ в соответствии с t-критерием Стьюдента.

Таблица 5. Профиль чувствительности штаммов CCGC19/16 и *B. cereus* ATCC 10702

Антибиотик	Содержание антибиотика в диске, мкг		Чувствительность / резистентность		Зона задержки роста, средний диаметр, мм	
			<i>B. cereus</i> ATCC 10702	CCGC 19/16	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	CCGC 19/16
Пенициллины						
Пенициллин	PEN5	5	Р	Ч	6	29
Ампициллин	API2	2	Р	Ч	6	30
Амоксициллин	A25	25	р	Ч	6	42
Цефалоспорины						
Цефазолин	CPX30	30	Ч	Ч	17	19
Цефокситин	FOX30	30	Р	Ч	6	15
Цефтриаксон	CRO30	30	Р	Ч	6	12
Цефемы						
Цефотаксим	CTX5	5	Р	Р	6	6
Цефтазидим-авибактам	CZA14C	14	Р	Р	6	6
Карбапенемы						
Имипенем	IMP10	10	Ч	Ч	32	45
Меропенем	MEM10	10	Ч	Ч	26	30
Эртапенем	ETP10	10	Ч	Ч	16	30
Хинолоны						
Норфлоксацин	NXN10	10	Ч	Ч	22	30
Ципрофлоксацин	CIP5	5	Ч	Ч	23	34
	CIP5	1	Ч	Ч	19	28
Левифлоксацин	LVX5	5	Ч	Ч	22	36
Моксифлоксацин	MXF5	5	Ч	Ч	24	36
Гликопептиды						
Ванкомицин	VAN5	5	Ч	Ч	15	20
	VAN30	30	Ч	Ч	17	22
Аминогликозиды						
Гентамицин	GMN10	10	Ч	Ч	22	29
Тобрамицин	TMN10	10	Ч	Ч	15	20
Макролиды						
Эритромицин	E15	15	Ч	Ч	23	29
Азитромицин	ATH15	15	Ч	Ч	20	28
Кларитромицин	CLA15	15	Ч	Ч	25	33
	CLA2	2	Ч	Ч	20	27
Линкозамиды						
Клиндамицин	CD2	2	Ч	Ч	21	27
Оксазолидоны						
Линезолид	LNZ30	10	Ч	Ч	27	36
	LNZ10	10	Ч	Ч	22	32
Липопептиды						
Полимиксин	PB300	300	Р	Ч	7	15
Колистин	CO10	10	Р	Р	6	6
	CO25	25	Р	Ч	6	12
Тетрациклины						
Тетрациклин	TET10	10	Р	Ч	20	32
Доксициклин	DOX30	30	Ч	Ч	26	32

Окончание таблицы 5

Антибиотик	Содержание антибиотика в диске, мкг		Чувствительность / резистентность		Зона задержки роста, средний диаметр, мм	
			<i>B. cereus</i> ATCC 10702	CCGC 19/16	<i>B. cereus</i> ATCC 10702	CCGC 19/16
Сульфаниламиды						
Триметоприм-сульфаметоксазол	SXT25	25	Р	Ч	6	27
Фениколы						
Хлорамфеникол	C30	30	Ч	Ч	25	30

Примечание. Р – штамм устойчив к данному антибиотику, Ч – штамм чувствителен к данному антибиотику. Степень чувствительности штаммов к антибиотикам определяли по диаметру зоны ингибирования роста в соответствии с рекомендациями EUCAST (Breakpoint table 14.0, 2024).

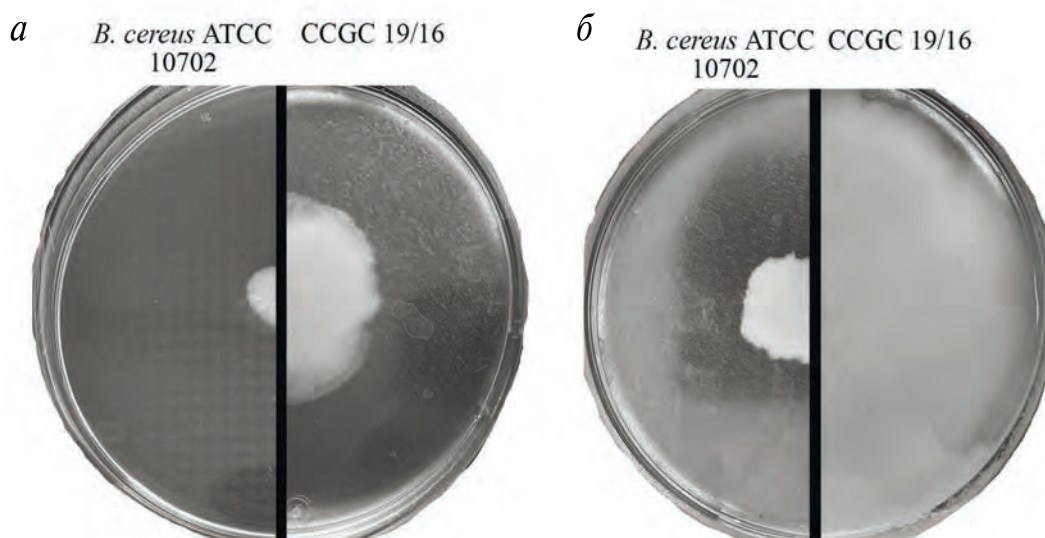


Рис. 4. Оценка подвижности *B. cereus* ATCC 10702 и CCGC19/16. а – Диаметр колоний штаммов после 24 ч инкубации; б – диаметр колоний после 48 ч инкубации.

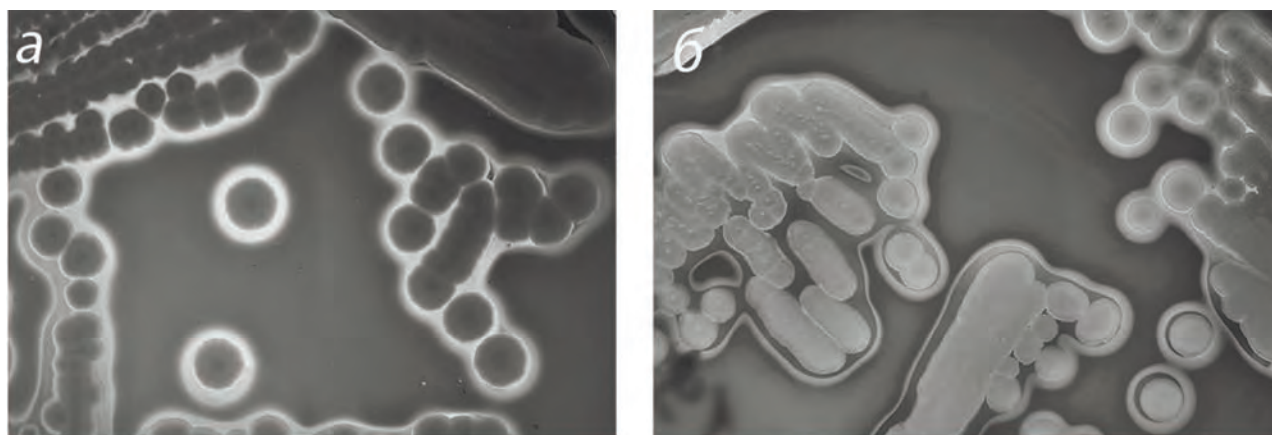


Рис. 5. Оценка размера зон гемолиза у штаммов группы *B. cereus*. а – Штамм *B. cereus* ATCC10702, б – Штамм CCGC19/16.

Более трудоемкий, но надежный метод MLST предполагает анализ нескольких геномных локусов. Будучи относительно дешевым и быстрым по сравнению с методами полногеномного анализа, он может быть использован для идентификации клинических изолятов рода *Bacillus*.

По-видимому, ни вегетативные клетки, ни споры штамма CCGC19/16 не обладают термостойкостью. Это, с одной стороны, сближает его с видом *B. cereus*, а с другой, необходимо уточнение физиологических характеристик у *B. cytotoxicus* [20]. Из полученных данных следует, что термостойкость не может быть надежным критерием характеристики вида *B. cytotoxicus*.

Штаммы внутри видов и внутри группы *B. cereus* могут значительно отличаться степенью патогенности, несмотря на наличие генетических элементов, определяющих их патогенные свойства, но не используемых для классификации. Ярким примером могут служить штаммы *B. cereus*, которые содержат плазмиды, напоминающие мегаплазмиды *B. anthracis*, кодирующие сибиреязвенный токсин и капсулу, обеспечивающую патогенный потенциал, сопоставимый с потенциалом *B. anthracis* [28, 29]. В то же время, описаны природные авирулентные штаммы *B. anthracis* [30, 31]. Следует отметить, что потенциально опасный изолят *B. anthracis* CDC684 был изначально описан как *B. megaterium* CDC684 [31]. Эти примеры показывают, что классификация штаммов *B. cereus* s.l. не имеет прямой связи с вирулентностью. Однако точная идентификация изолятов, относящихся к потенциально опасным видам, позволит дополнить результаты исследований, направленных на выявление патогенных свойств, и при необходимости принять своевременные лечебные и противоэпидемические меры.

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН за предоставленные вычислительные мощности и методики анализа данных.

Часть работы выполнена на оборудовании ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/RUSSIAN_NEW/INSTITUTE/ccu_genome_c.php).

Работа в части MLST-анализа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF----193021X0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu Y., Du J., Lai Q., Zeng R., Ye D., Xu J., Shao Z. (2017) Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**(8), 2499–2508.
2. Miyata J., Tasaka S., Miyazaki M., Yoshida S., Naoki K., Sayama K., Asano K., Fujiwara H., Ohkusu K., Hasegawa N., Betsuyaku T. (2013) *Bacillus cereus* necrotizing pneumonia in a patient with nephrotic syndrome. *Int. Med.* **52**(1), 101–104.
3. Worapongsatitaya P.T., Pupaibool J. (2022) *Bacillus cereus* meningoencephalitis in an immunocompetent patient. *IDCases.* **29**, e01577.
4. Inoue D., Nagai Y., Mori M., Nagano S., Takiuchi Y., Arima H., Kimura T., Shimoji S., Togami K., Tabata S., Yanagita S., Matsushita A., Nagai K., Imai Y., Takegawa H., Takahashi T. (2010) Fulminant sepsis caused by *Bacillus cereus* in patients with hematologic malignancies: analysis of its prognosis and risk factors. *Leuk. Lymphoma.* **51**(5), 860–869.
5. Ikeda M., Yagihara Y., Tatsuno K., Okazaki M., Okugawa S., Moriya K. (2015) Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* blood stream infections. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **14**, 43.
6. Guinebretiere M.H., Auger S., Galleron N., Contzen M., De Sarrau B., De Buyser M.L., Lamberet G., Fagerlund A., Granum P.E., Lereclus D., De Vos P., Nguyen-The C., Sorokin A. (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**(Pt 1), 31–40.
7. Liu Y., Lai Q., Goker M., Meier-Kolthoff J.P., Wang M., Sun Y., Wang L., Shao Z. (2015) Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* **5**, 14082.
8. Carroll L.M., Cheng R.A., Wiedmann M., Kovac J. (2022) Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **62**(28), 7677–7702.
9. Schoch C.L., Ciuffo S., Domrachev M., Hottot C.L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., McVeigh R., O'Neill K., Robbertse B., Sharma S., Sousoff V., Sullivan J.P., Sun L., Turner S., Karsch-Mizrachi I. (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. **2020**, baaa062.
10. Daffonchio D., Raddadi N., Merabishvili M., Cherif A., Carmagnola L., Brusetti L., Rizzi A., Chanishvili N., Visca P., Sharp R., Borin S. (2006) Strategy for identification of *Bacillus cereus* and

- Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(2), 1295–1301.
11. Chelliah R., Wei S., Park B. J., Kim S. H., Park D. S., Kim S. H., Hwan K. S., Oh D. H. (2017) Novel motB as a potential predictive tool for identification of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and differentiation from other *Bacillus* species by triplex real-time PCR. *Microb. Pathog.* **111**, 22–27.
 12. Olsen J. S., Skogan G., Fykse E. M., Rawlinson E. L., Tomaso H., Granum P. E., Blatny J. M. (2007) Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on *adk*-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. *J. Microbiol. Meth.* **71**(3), 265–274.
 13. Clark A. E., Kaleta E. J., Arora A., Wolk D. M. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**(3), 547–603.
 14. Cairo J., Gherman I., Day A., Cook P. E. (2022) *Bacillus cytotoxicus* — a potentially virulent food-associated microbe. *J. Appl. Microbiol.* **132**(1), 31–40.
 15. Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T. L., Agarwala R., Schaffer A. A. (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics.* **24**(16), 1757–1764.
 16. Jolley K. A., Bray J. E., Maiden M. C. J. (2018) Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* **3**, 124.
 17. Liang Q., Liu C., Xu R., Song M., Zhou Z., Li H., Dai W., Yang M., Yu Y., Chen H. (2021) fIDBAC: a platform for fast bacterial genome identification and typing. *Front. Microbiol.* **12**, 723577.
 18. Beaman T. C., Gerhardt P. (1986) Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(6), 1242–1246.
 19. Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M., Geider K. (2008) Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One.* **3**(7), e2843.
 20. Смирнова Т. А., Сухина М. А., Гречников А. А., Поддубко С. В., Зубашева М. В., Грумов Д. А., Богданов И. А., Переборова А. А., Козлова В. А., Плиева З. С., Щербинин Д. Н., Андреевская С. Г., Шевлягина Н. В., Соловьев А. И., Карпов Д. С., Поляков Н. Б., Жуховицкий В. Г. (2023) Идентификация клинических изолятов группы *Bacillus cereus* и их характеристика методами масс-спектрометрии и электронной микроскопии. *Молекуляр. биология.* **57**(4), 609–622.
 21. Shu L. J., Yang Y. L. (2017) *Bacillus* classification based on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry — effects of culture conditions. *Sci. Rep.* **7**(1), 15546.
 22. Kim K., Seo J., Wheeler K., Park C., Kim D., Park S., Kim W., Chung S. I., Leighton T. (2005) Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**(2), 301–310.
 23. Hsieh Y. M., Sheu S. J., Chen Y. L., Tsen H. Y. (1999) Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *J. Appl. Microbiol.* **87**(4), 481–490.
 24. Oliwa-Stasiak K., Molnar C. I., Arshak K., Bartoszcz M., Adley C. C. (2010) Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *J. Appl. Microbiol.* **108**(1), 266–273.
 25. Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebretiere M. H., Lindback T., Andersson M., Schulz A., Fricker M., Christiansson A., Granum P. E., Martlbauer E., Nguyen-The C., Salkinoja-Salonen M., Scherer S. (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology (Reading).* **151**(1), 183–197.
 26. Parte A. C., Sarda Carbasse J., Meier-Kolthoff J. P., Reimer L. C., Goker M. (2020) List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**(11), 5607–5612.
 27. Riley E. P., Schwarz C., Derman A. I., Lopez-Garrido J. (2020) Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microb. Cell.* **8**(1), 1–16.
 28. Klee S. R., Brzuszkiewicz E. B., Nattermann H., Bruggemann H., Dupke S., Wollherr A., Franz T., Pauli G., Appel B., Liebl W., Couacy-Hymann E., Boesch C., Meyer F. D., Leendertz F. H., Ellerbrok H., Gottschalk G., Grunow R., Liesegang H. (2010) The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One.* **5**(7), e10986.
 29. Wilson M. K., Vergis J. M., Alem F., Palmer J. R., Keane-Myers A. M., Brahmabhatt T. N., Ventura C. L., O'Brien A. D. (2011) *Bacillus cereus* G9241 makes anthrax toxin and capsule like highly virulent *B. anthracis* Ames but behaves like attenuated toxigenic nonencapsulated *B. anthracis* Sterne in rabbits and mice. *Infect. Immun.* **79**(8), 3012–3019.
 30. Apriliana U., Wibawa H., Ruhiat E., Untari T., Indarjulianto S. (2021) Isolation and identification of avirulent strains of *Bacillus anthracis* from environmental samples in Central Java, Indonesia. *Int. J. One Hlth.* **7**(2), 204–211.
 31. Okinaka R. T., Price E. P., Wolken S. R., Gruendike J. M., Chung W. K., Pearson T., Xie G., Munk C., Hill K. K., Challacombe J., Ivins B. E., Schupp J. M., Beckstrom-Sternberg S. M., Friedlander A., Keim P. (2011) An attenuated strain of *Bacillus anthracis* (CDC684) has a large chromosomal inversion and altered growth kinetics. *BMC Genomics.* **12**, 477.

Identification of Clinical Isolate CCGC 19/16 as *Bacillus cytotoxicus*

N. B. Polyakov^{1, 2}, D. S. Karpov³, M. V. Zubasheva^{1,*}, A. N. Polyakova⁴,
D. N. Shcherbinin¹, A. I. Solovyev¹, M.V. Lavrentiev¹, T. A. Smirnova¹,
M. A. Sukhina⁵, V. G. Zhukhovitsky^{1, 6}

¹*Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology,
Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

²*Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

³*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies
for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

⁴*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

⁵*Ryzhikh State Research Center of Coloproctology, Ministry of Public
Health, Moscow, 123423 Russia*

⁶*Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (RMANPO),
Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 125993 Russia*

*e-mail: mzubasheva@mail.ru

Bacillus cereus sensu lato s.l. comprises genetically, morphologically and physiologically similar gram-positive spore-forming bacterial species with high pathogenic potential, such as *B. anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*. Toxin-producing strains of *B. cereus s.l.* pose a major threat to human health. The high degree of similarity between these species makes it very difficult to identify them and to take adequate measures to treat the diseases they cause. Previously, we characterized a clinical isolate CCGC 19/16 belonging to *B. cereus s.l.* that exhibited features of both *B. cereus* and *B. cytotoxicus*. In the present work, CCGC 19/16 was identified as *B. cytotoxicus* using multilocus sequence typing (MLST) and mass spectrometric analysis. It was also shown that, unlike other representatives of the *B. cytotoxicus* species, strain CCGC 19/16 is not thermotolerant. Unlike *B. cereus*, strain CCGC 19/16 is sensitive to most antibiotics and shows increased motility. Like *B. cereus* strain CCGC 19/16 forms β -hemolysis zones in blood agar. In addition, it has been shown that prolonged storage of samples prior to analysis can lead to misidentification of the isolate. Our results indicate that “rapid methods” of analysis using single genes have insufficient resolving power in the identification of *B. cereus s.l.* species. The combination of MLST analysis with MALDI-TOF MS provides sufficient resolution.

Keywords: *Bacillus cereus* group, *Bacillus cytotoxicus*, mass spectrometry, MLST

ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ В МИКРОБИОТЕ КИШЕЧНИКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА: ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СОДЕРЖАНИЯ

© 2024 г. Ш. А. Бегматов^{а, *}, А. В. Белецкий^а, А. Л. Ракитин^а, А. П. Лукина^б,
Л. О. Соколянская^б, А. В. Ракитин^б, Л. Б. Глухова^б, А. В. Марданов^а,
О. В. Карначук^б, Н. В. Равин^а

^аИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071

^бТомский государственный университет, Томск, 634050

*e-mail: shabegmatov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.04.2024 г.

После доработки 13.06.2024 г.

Принята к публикации 15.06.2024 г.

Резистентность к противомикробным препаратам – актуальная проблема не только здравоохранения, но и животноводства. Широкое применение противомикробных препаратов в составе кормовых добавок относится к одной из основных причин быстрого распространения резистентности представителей микробиоты желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных. Для характеристики генов антибиотикорезистентности (резистема) мы провели метагеномный анализ фекалий 24 голов крупного рогатого скота (КРС) из разных регионов России и Казахстана, включая коров разных пород и яков. Они различались по способу разведения: отгонно-пастбищное с круглогодичным нахождением на пастбищах или стойловое, когда животные получают кормовые добавки. Хотя в образцах обеих групп животных были обнаружены гены устойчивости к аминогликозидам, β-лактамам, гликопептидам, антибиотикам МЛС-группы (макролиды, линкозамиды и стрептограмин), фениколам и тетрациклинам, содержание резистема в микробиоме фекалий КРС, разводимых в стойловых условиях, было примерно в 10 раз выше, чем у животных, содержащихся на пастбищах. В резистеме стойловых КРС доминировали β-лактамазы и гены устойчивости к тетрациклинам, содержание которых в микробиоме было соответственно в 24 и 60 раз выше, чем у животных, содержащихся на пастбищах. По-видимому, распространение устойчивости к β-лактамам и тетрациклинам у КРС, разводимого в стойловых условиях, отражает активное использование этих антибиотиков в животноводстве. Метагеномный анализ фекалий сельскохозяйственных животных может быть использован для количественного определения генов антибиотикорезистентности с целью мониторинга антибиотиков, применяемых при содержании животного.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, животноводство, антибиотики, антибиотикорезистентность, метагеномика, микробиом, яки, коровы

DOI: 10.31857/S0026898424060105, **EDN:** IALWAS

ВВЕДЕНИЕ

Проблема резистентности к противомикробным препаратам актуальна не только для здравоохранения, но и в сельском хозяйстве, в частности в животноводстве. В настоящее время наблюдается быстрый рост числа штам-

мов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [1]. Серьезную озабоченность вызывают устойчивые к лекарственным препаратам штаммы *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. Эти виды бактерий не только возбудители рас-

Сокращения: АРГ – гены резистентности к антибиотикам; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; КРС – крупный рогатый скот; МЛС – макролиды, линкозамиды и стрептограмин; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ОТЕ – оперативные таксономические единицы; MAG (metagenome assembled genome) – геном, собранный из метагенома.

пространенных инфекционных заболеваний, но и источники генов резистентности к антибиотикам (АРГ), в основном полученных в результате горизонтального переноса [2]. Общий экономический ущерб от этих резистентных бактерий только в США составляет 2.8 млрд долларов ежегодно [3].

Широкое применение противомикробных препаратов в животноводстве — в составе кормовых добавок и в качестве ветеринарных препаратов — считается одной из основных причин быстрого роста числа мультирезистентных штаммов [4]. Использование антибиотиков в животноводстве значительно превышает масштаб их использования в медицине. Нельзя отрицать тот факт, что благодаря их применению стало возможным интенсивное животноводство. По прогнозам, к 2030 году потребление антибиотиков в животноводстве увеличится на 67% во всем мире и почти удвоится в Бразилии, России, Индии, Китае и Южной Африке [5]. Проблема распространения резистентных к антибиотикам штаммов микроорганизмов у сельскохозяйственных животных не ограничивается собственно сферой животноводства, поскольку устойчивые бактерии и гены резистентности могут передаваться человеку либо с пищей, либо через окружающую среду, в которую попадают отходы жизнедеятельности животных (навоз и др.) [1].

Микробиом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) сельскохозяйственных животных относится к важным факторам их нормальной жизнедеятельности, обеспечивая переваривание корма и усвоение питательных веществ. Микробные сообщества ЖКТ травоядных обеспечивают гидролиз сложных растительных полисахаридов, включая целлюлозу и различные гемицеллюлозы. Микробиоту ЖКТ составляют эукариоты (грибы, простейшие), археи и бактерии в концентрациях порядка 10^4 , 10^6 и 10^{10} соответственно [6]. Высокая концентрация микроорганизмов создает благоприятные условия для горизонтального переноса генов внутри микробного сообщества и формирования (мульти)резистентных штаммов в условиях селективного давления, обусловленного присутствием антибиотиков в ЖКТ.

Метагеномный анализ позволяет выявлять набор генов, имеющих в микробном сообществе, без культивирования отдельных штаммов микроорганизмов и благодаря этому широко используется для характеристики резистома (совокупности генов устойчивости к антибиотикам) в микробиоте ЖКТ сельскохозяйственных животных. Так, в 2020 году S. Lim и др. [7] сообщали о результатах метагеномного анализа микробиома ЖКТ 36 свиней и 41 особи круп-

ного рогатого скота (КРС) на фермах в Корею. Авторы обнаружили, что гены, кодирующие устойчивость к аминогликозидам, β -лактамам, линкозамидам, стрептограминам и тетрациклинам преобладали в резистомах как свиней, так и КРС. Тогда же Z. Zhu и соавт. [8] секвенировали метагеномы ЖКТ 30 голов коров и яков и выявили 42 типа АРГ, причем разнообразие и численность последних у яков были значительно ниже, чем у коров. Значительная часть АРГ была связана с интегронами, что указывало на роль горизонтального переноса в распространении генов резистентности. Недавно, в 2023 году, вышла работа W. Wang и др. [9] по исследованию резистома ЖКТ коров с помощью метагеномного анализа. В 40 образцах фекалий было выявлено 1688 АРГ, которые могут обеспечивать устойчивость к тетрациклинам, хинолонам, β -лактамам и аминогликозидам, широко используемым в медицине и ветеринарии.

Хотя проблема распространения резистентности к антибиотикам в сфере животноводства актуальна и для Российской Федерации, такие исследования с применением методов метагеномики остаются немногочисленными. Большинство работ сфокусировано на выделении отдельных чистых культур микроорганизмов и проверке их устойчивости к антибиотикам классическими микробиологическими методами, что не дает полной информации о резистоме микробиоты ЖКТ в целом. В результате проведенного нашей исследовательской группой метагеномного анализа навозохранилища крупного свиноводческого хозяйства обнаружено несколько сот АРГ, среди которых преобладали гены, обеспечивающие устойчивость к тетрациклинам, антибиотикам МЛС-группы и аминогликозидам [10].

В представленной работе мы использовали метагеномный анализ для характеристики состава резистома микробиоты кишечника КРС, содержащегося в разных условиях. В качестве объектов исследования мы выбрали три группы животных: (1) КРС (*Bos taurus*, коровы и быки) галловейской породы, (2) яки (*Bos grunniens*) и (3) КРС из агроферм и частных хозяйств разных регионов. Первые две группы животных разводили отгонно-пастбищным способом в экологически чистом регионе горного Алтая, а третья группа животных объединяла КРС, выращиваемый стойлово-пастбищным методом и получающий кормовые добавки, которые могли содержать антибиотики. В связи с тем, что развитие устойчивости к антибиотикам — естественный процесс и встречается в природных условиях, мы считали, что резистом галловейских КРС и яков представляет собой “естественный” фон, а “стойловых” КРС — ре-

зистом, обогащенный генами устойчивости к антибиотикам, применяемым в кормовых добавках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал исследования. Исследованные образцы фекалий были собраны в частных хозяйствах разных регионов Российской Федерации и Казахстана в ноябре–декабре 2021 года

(табл. 1). Образцы фекалий галловейского КРС (3 пробы) и яков (3 пробы), находившихся на круглогодичном свободном выпасе, отбирали из разных точек пастбища – чтобы минимизировать вероятность сбора образцов от одного и того же животного. Температура воздуха во время отбора проб составляла от -15°C до -20°C , что обеспечивало быстрое естественное замораживание фекалий. Остальные образцы фекалий коров (18 проб) собирали от разных животных, содержа-

Таблица 1. Места сбора образцов фекалий животных

Идентификатор образца	Животное	Географическая локация	Координаты
KG220	КРС, <i>B. taurus</i> , галловейская порода, возраст и пол неизвестны	с. Черга, Шебалинский район, Республика Алтай	51.517429 N, 85.542328 E
KG226	КРС, <i>B. taurus</i> , галловейская порода, возраст и пол неизвестны	с. Черга, Шебалинский район, Республика Алтай	51.517429 N, 85.542328 E
KG228	КРС, <i>B. taurus</i> , галловейская порода, возраст и пол неизвестны	с. Черга, Шебалинский район, Республика Алтай	51.517429 N, 85.542328 E
KY236	Як, <i>B. grunniens</i> , возраст и пол неизвестны	урочище Уландрык, Кош-Агачский р-н, Республика Алтай	49.5826700 N, 89.0067260 E
KY245	Як, <i>B. grunniens</i> , возраст и пол неизвестны	урочище Уландрык, Кош-Агачский район, Республика Алтай	49.5826700 N, 89.0067260 E
KY254	Як, <i>B. grunniens</i> , возраст и пол неизвестны.	урочище Уландрык, Кош-Агачский район, Республика Алтай	49.5826700 N, 89.0067260 E
KA0046	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет	Фатежский район, Курская область	52.0817561 N, 35.8284784 E
KA0047	КРС, <i>B. taurus</i> , бык, 5 лет, симментальская порода	Фатежский район, Курская область	52.0817561 N, 35.8284784 E
KA0049	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, симментальская порода	Фатежский район, Курская область	52.0817561 N, 35.8284784 E
KA0050	КРС, <i>B. taurus</i> , бык, 1 год, порода неизвестна	Чермисиновский район, Курская область	51.9307859 N, 37.2833153 E
KA0045	КРС, <i>B. taurus</i> , возраст, пол и порода неизвестны	Чермисиновский район, Курская область	51.9307859 N, 37.2833153 E
KA00821	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 3 года, голштинская порода, агроферма	Искитимский район, Новосибирская область	55.0953625 N, 80.9652734 E
KA00841	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, голштинская порода, возраст неизвестен	Искитимский район, Новосибирская область	55.0953625 N, 80.9652734 E
KA0106	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 3 года, голштинская порода, агроферма	Искитимский район, Новосибирская область	55.0953625 N, 80.9652734 E
KA0036	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 7 лет, краснопестрая порода	с. Троицкое, Омская область	54.86845000 N, 73.30630036 E
KA0038	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 9 лет, краснопестрая порода	с. Троицкое, Омская область	54.86845000 N, 73.30630036 E
KA0021	КРС, <i>B. taurus</i> , бык, 3 года, симментальская порода	Альшеевский район, Республика Башкортостан	53.8834471 N, 54.6000000 E
KA0024	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 7 лет, симментальская порода	Альшеевский район, Республика Башкортостан	53.8834471 N, 54.6000000 E
KA0029	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, симментальская порода	Альшеевский район, Республика Башкортостан	53.8834471 N, 54.6000000 E

Окончание таблицы 1

Идентификатор образца	Животное	Географическая локация	Координаты
КА0037	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, айрширская порода, частное хозяйство	Уалихановский район, Казахстан	53.9798286 N, 73.0993498 E
КА0040	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 1 год, чернопестрая порода, частное хозяйство	Уалихановский район, Казахстан	53.9798286 N, 73.0993498 E
КА0075	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, чернопестрая порода, агроферма	Увимский район, Республика Удмуртия	57.032200 N, 52.314700 E
КА0076	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 1 год, чернопестрая порода, частное хозяйство	Увимский район, Республика Удмуртия	57.032200 N, 52.314700 E
КА0079	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, чернопестрая порода, агроферма	Увимский район, Республика Удмуртия	57.032200 N, 52.314700 E

щихся на фермах и в частных хозяйствах. После отбора пробы замораживали в мобильной морозильной камере, поддерживающей температуру -20°C , а после доставки в лабораторию хранили при -80°C до выделения ДНК.

Выделение ДНК. Препараты суммарной ДНК из фекалий выделяли с помощью наборов Power Soil kit (“Qiagen”, Германия). Количество метагеномной ДНК определяли с помощью наборов Qubit dsDNA HS Assay kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Из каждого образца выделяли >5 мкг ДНК, что было достаточно для работ по секвенированию метагеномов.

Аmplификация фрагментов гена 16S рРНК, секвенирование и биформатическая обработка данных. Варибельный V3–V4 район гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров: 341F (5'-CCTAYGGGDBGCWSCAG) и 806R (5'-GGACTACNVGGGTHTCTAAT) [11]. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с использованием Agencourt AMPure Beads (“Beckman Coulter, Brea”, США), концентрацию измеряли с помощью Qubit dsDNA HS Assay kit (“Invitrogen”, США). Очищенные ПЦР-фрагменты использовали для приготовления библиотек секвенирования с помощью наборов Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США). ПЦР-фрагменты секвенировали на Illumina MiSeq (2 × 300 нуклеотидов с двух сторон). Парные чтения объединяли с помощью FLASH v.1.2.11 [12]. После исключения чтений низкого качества и “химер”, чтения всех образцов кластеризовали в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) с минимальной идентичностью 97%, что соответствует уровню вида. Для определения доли ОТЕ в каждом из образцов на их репрезентативные последовательности накладывали исходные чтения с минимальной идентичностью 97% по всей длине. Для выполнения

всех этих процедур использовали пакет программ USEARCH v.11 [13]. Таксономическую идентификацию бактерий и архей по последовательностям генов 16S рРНК проводили с использованием алгоритма VSEARCH v.2.14.1 [14] по базе данных SILVA v.138 [15].

Секвенирование и сборка метагеномов. Для приготовления библиотек для секвенирования метагеномной ДНК использовали наборы NEBNext Ultra II DNA Library prep kit (“NEB”, США). Полученные библиотеки секвенировали на Illumina NovaSeq 6000 в формате парных чтений (2 × 150 н.). Удаление адаптеров и исключение низкокачественных последовательностей ($Q < 30$) выполнены с использованием Cutadapt v.1.8.3 [16] и Sickle v.1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>, доступен 29.05.2024) соответственно. Сборку контигов проводили с помощью программного пакета MEGANIT v.1.2.9 [17]. Сборку геномов из метагеномов (metagenome assembled genome, MAG) проводили с использованием MetaBAT v.2.2.15 [18]. Полноту MAG и их возможную контаминацию (избыточность) оценивали с помощью CheckM v.1.1.3 [19]. Собранные MAG были таксономически идентифицированы с использованием программного пакета GTDB-Tk v.1.5.0 [20] и базы данных геномной таксономии (genome taxonomy database, GTDB) [21].

Чтения, относящиеся к генам 16S рРНК бактерий и архей, были определены наложением на базу данных SILVA v.138 программой Bowtie2 [22] с минимальной гомологией 90%.

Поиск и аннотация генов устойчивости к антибиотикам. Открытые рамки считывания (ОРС) в контигах идентифицировали с использованием программы Prodigal v2.6.3 [23]. Для идентификации предполагаемых АРГ предсказанные белковые последовательности ОРС сравнивали с базой данных генов устойчивости к антибиотикам NCBI с использованием программы

NCBI AMRFinderPlus v.3.11.4. (<https://github.com/ncbi/amr/wiki>, доступен 29.05.2024) на командной строке с параметром “-p” [24].

Информация о доступности полученных последовательностей фрагментов гена 16S рНК и метагеномов. Первичные последовательности фрагментов гена 16S рНК и метагеномов фекалий животных депонированы в базе NCBI Sequence Read Archive (SRA) и доступны в BioProject PRJNA785979.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разнообразие и состав микробиоты

Для характеристики микробиоты ЖКТ 24 животных (3 КРС галловейской породы, 3 яков и 18 “стойловых” особей КРС) было идентифицировано 433315 последовательностей фрагментов гена 16S рНК (от 9735 до 58722 на образец). Результаты кластеризации последовательностей ампликонов гена 16S рНК показали, что число обнаруженных ОТЕ на уровне вида составляло от 1.80 до 3.25 тыс. Оценка альфа-разнообразия по индексу Shannon не выявила существенных отличий между микробными сообществами исследованных животных (значение shannon_е в диапазоне 4.14–5.64).

В микробных сообществах ЖКТ животных доминирующими были филумы Firmicutes (в среднем 59.2, 49.6 и 50.7% для галловейского КРС, яков и “стойлового” КРС соответственно) и Bacteroidota (25.1, 31.2 и 33.3% соответственно) (рис. 1). Среди других отно-

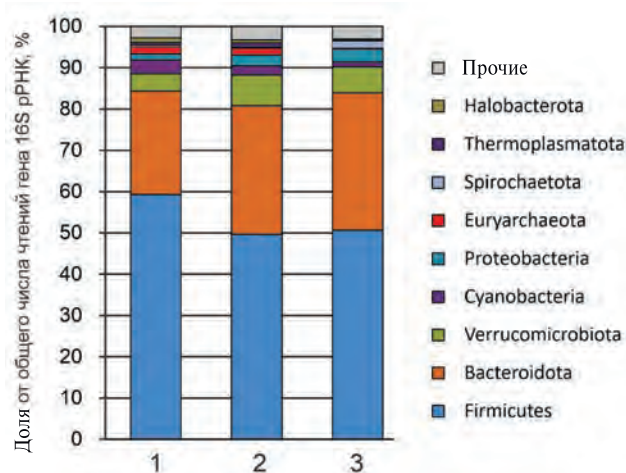


Рис. 1. Таксономический состав микробных сообществ образцов фекалий галловейского КРС (1), яков (2) и “стойлового” КРС (3). На рисунке представлены филумы, средняя доля которых в сообществах составляет не менее 1%.

сительно многочисленных групп обнаружены бактерии филумов Verrucomicrobiota (4.2–7.4%), Proteobacteria (1.5–3.1%), Cyanobacteria (1.2–3.3%), Spirochaetota (0.2–1.6%). Заметные отличия между (i) галловейским КРС и яками и (ii) “стойловым” КРС зарегистрированы для метаногенных архей, которых в первой группе было в несколько раз больше. Так, содержание Euryarchaeota у галловейского КРС, яков и “стойлового” КРС составляло 1.8, 1.7 и 0.4%, а Halobacterota – 1.1, 0.7 и 0.3% соответственно.

Разнообразие резистома

В результате секвенирования метагеномов 23 образцов фекалий животных определено от 8.8 до 22.3 млрд нуклеотидов, собрано от 0.93 до 6.0 млн контигов с длиной N50 от 606 до 2584 нуклеотидов. Еще для одного образца (КА0029) секвенировано около 1 млрд нуклеотидов, собрано 159 тыс. контигов (N50–606 нуклеотидов). В этих контигах суммарно предсказано 1565 генов устойчивости к антибиотикам – от 13 до 147 на образец. В связи с тем, что объем секвенирования и суммарная длина собранных контигов для разных образцов существенно отличались, в дальнейшем при сравнении образцов число генов резистентности нормировали на 10^9 нуклеотидов суммарной длины собранных контигов (рис. 2). По этому показателю микробиоты трех групп животных существенно отличались: минимальное содержание АРГ идентифицировали у яков (9.8–14.6, в среднем 11.35 АРГ/ 10^9 нуклеотидов), более высокое у галловейского КРС (15.8–21.9, в среднем 18.5 АРГ/ 10^9 нуклеотидов) и наибольшее у “стойлового” КРС (21.7–68.0, в среднем 38.9 АРГ/ 10^9 нуклеотидов, без учета образца КА0029). В образце КА0029 выявлено аномально высокое число АРГ – 138.8 АРГ/ 10^9 нуклеотидов – в сочетании с их низким разнообразием. Скорее всего, это связано с недостаточным объемом метагеномного секвенирования, что стало причиной исключения образца КА0029 из дальнейшего анализа разнообразия АРГ. Абсолютное большинство АРГ относилось к 9 семействам (рис. 2): аминогликозид-фосфотрансферазы, белки защиты рибосомы ABC-F типа (ABC-F type ribosomal protection protein), кластер генов устойчивости к гликопептидам (Van), хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, линкозамид-нуклеотидилтрансферазы, металло- β -лактамазы, β -лактамазы класса А, обеспечивающий устойчивость к тетрациклину белок защиты рибосом (tetracycline-resistant ribosomal protection protein) и стрептограмин-ацетилтрансферазы (Vat). Гены восьми из девяти семейств встречались во всех трех группах животных. Гены белка защиты рибосом, обеспечивающего устойчивость к тетра-

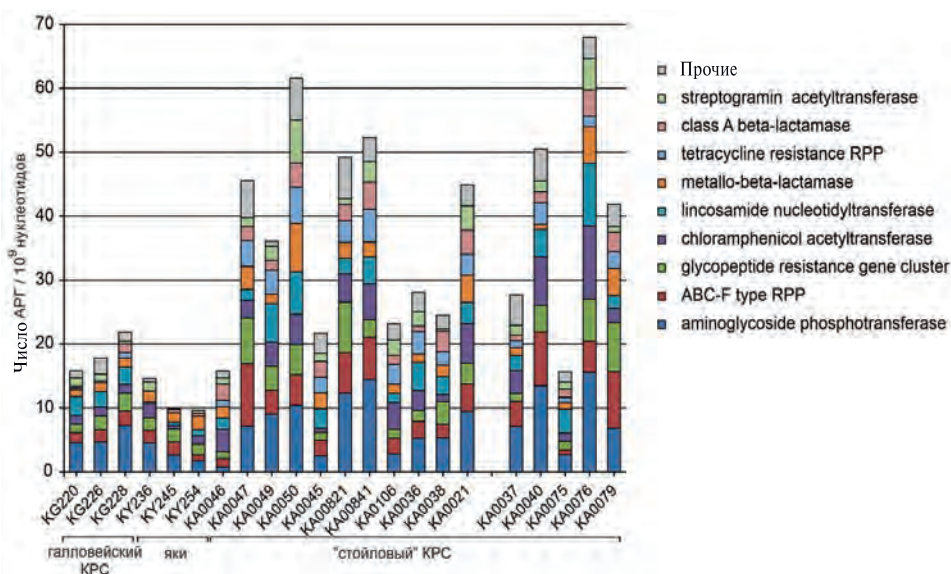


Рис. 2. Резистомы образцов фекалий, классифицированные по семействам ARG. По оси ординат указано число ARG, идентифицированных в метагеноме, на 10^9 нуклеотидов суммарной длины собранных контигов. Справа указаны следующие кластеры генов (сверху вниз): стрептограмин-ацетилтрансфераза; β -лактамаза класса A; обеспечивающий устойчивость к тетрациклину белок защиты рибосом; металло- β -лактамаза; линкозамид-нуклеотидилтрансфераза; хлорамфеникол-ацетилтрансфераза; кластер генов устойчивости к гликопептидам; белки защиты рибосомы ABC-F типа; аминогликозид-фосфотрансфераза.

циклину, не обнаружены в микробиоме ЖКТ яков, редко встречались у галловейского КРС ($0.27\text{--}0.91$ ARG/ 10^9 нуклеотидов), но были во множестве представлены у “стойлового” КРС ($0.79\text{--}5.69$ ARG/ 10^9 нуклеотидов).

Геномы микроорганизмов — представителей микробиоты ЖКТ животных

Кластеризация контигов в MAG позволила собрать 708 геномов с полнотой более 80% и избыточностью (загрязнением) менее 10%, в том числе 695 MAG бактерий и 13 — архей. По результатам анализа, 147 MAG содержали хотя бы один ARG, а один MAG, собранный из метагенома фекалий “стойлового” КРС (KA0045), содержал гены *aph(3')*, *ermF*, *tetX2*, *aadS*, которые могут придавать устойчивость к аминогликозидам, тетрациклину и макролидам. Таксономическая классификация генома этого потенциально мультирезистентного штамма в соответствии с Genome Taxonomy Database (GTDB) показала, что он относится к бактерии *Treponema bryantii* (филум Spirochaetota).

Количественный анализ содержания генов устойчивости к антибиотикам

Приведенные выше результаты дают информацию о наличии различных генов устойчивости в микробиомах ЖКТ животных, но не их количественной представленности, которая

зависит от относительной численности соответствующих бактерий-хозяев в микробиоте. Кроме того, выделенная из образцов фекалий метагеномная ДНК может помимо ДНК микробиоты ЖКТ содержать ДНК животного-хозяина, кормовых растений и других, доля которых в разных образцах может отличаться. В связи с этим содержание ARG нормировали на содержание генов 16S рРНК в метагеноме фекалий. Для количественной оценки представленности конкретных ARG в микробиоме ЖКТ делили число чтений, соответствующих этому ARG, на число чтений, относящихся к генам 16S рРНК прокариот в анализируемом метагеноме (табл. S1, см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Begmatov_rus.pdf).

Результаты анализа показали, что содержание резистома в расчете на 16S рРНК в среднем составляло 0.22% у яков, 0.54% у галловейского КРС и было во много раз выше (3.41%) у “стойлового” КРС, причем отличия между всеми группами животных были статистически значимыми ($p < 0.01$). Процентное содержание и состав резистома у галловейского КРС и яков были в целом схожи, но резко отличались от этих показателей у “стойлового” КРС (рис. 3), поэтому в дальнейшем сравнивали две группы животных: “пастбищных”, находящихся на свободном выпасе (галловейский КРС и яки), и “стойловых”.

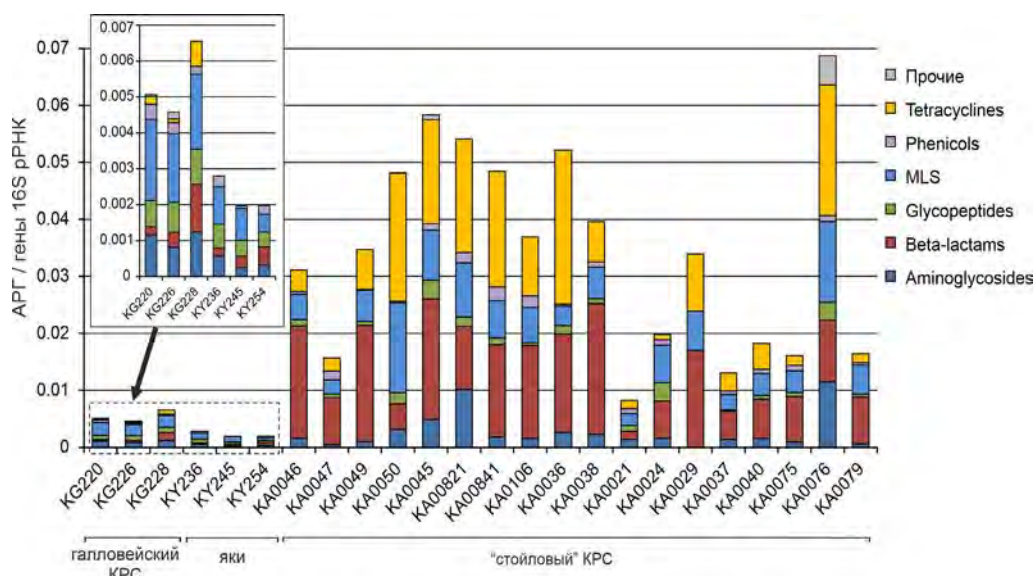


Рис. 3. Относительное содержание ARG в микробиоме кишечника галловейского КРС, яков и “стойлового” КРС представлено по классам антибиотиков. По оси ординат указано содержание ARG в метагеноме фекалий, нормированное на содержание генов 16S рНК. В левой части рисунка приведены данные для галловейского КРС и яков в увеличенном масштабе. Справа указаны следующие классы антибиотиков (сверху вниз): тетрациклины, фениколы, МЛС-группа, гликопептиды, β-лактамы, аминогликозиды.

Абсолютное большинство обнаруженных ARG может обеспечивать устойчивость к антибиотикам шести классов: аминогликозиды, β-лактамы, гликопептиды, МЛС-антибиотики, фениколы и тетрациклины. Гены устойчивости к антибиотикам других классов составляли менее 2% резистомов. Хотя содержание ARG всех шести классов было выше в метагеномах “стойловых” животных по сравне-

нию с “пастбищными”, по степени различий они четко разделялись на две группы (табл. 2). Гены β-лактамаз класса А, в основном *bla* и *cfxA*, были наиболее многочисленным классом ARG у “стойловых” животных, а их содержание в микробиоме ЖКТ “пастбищных” было ниже в среднем в 24 раза. Еще большие различия выявлены для генов устойчивости к тетрациклинам (*tetW*, *tetQ*, *tet(40)*,

Таблица 2. Представленность ARG к различным классам антибиотиков в микробиомах ЖКТ животных “пастбищной” и “стойловой” групп

ARG по классу антибиотика	Содержание ARG, нормированное на содержание генов 16S рНК		Средняя доля в резистоме (%)	
	“пастбищные”	“стойловые”	“пастбищные”	“стойловые”
β-лактамы	0.00050	0.01231	13.1	36.1
<i>bla</i>	0.00029	0.00725	7.6	21.2
<i>cfxA</i>	0.00018	0.00412	4.7	12.1
Тетрациклины	0.00017	0.01026	4.4	30.1
<i>tet(W)</i>	0.00013	0.00409	3.4	12.0
<i>tet(Q)</i>	0	0.00350	0	10.3
МЛС-группа	0.00145	0.00630	37.9	18.4
Аминогликозиды	0.00073	0.00270	19.1	7.9
Гликопептиды	0.00068	0.00126	17.8	3.8
Фениколы	0.00026	0.00092	6.8	2.7
Прочие	0.00004	0.00034	1.0	1.0
Всего	0.00382	0.03410	100	100

tetO и *tet(32)*), которые были вторым по представленности классом АРГ у “стойловых” животных. В группе “пастбищных” их средняя доля была ниже в 60 раз, причем у яков они не обнаружены вообще. Рассматривая конкретные гены в качестве маркеров “стойловых” животных, мы выделили следующие: *tetW*, *tetQ*, *bla* и *cfxA*, – на которые приходилось около половины их резистоста.

Намного меньшие отличия (в 2–4 раза) между “пастбищными” и “стойловыми” животными обнаружены для генов устойчивости к гликопептидным антибиотикам (*van*), МЛС (*abc-f*, *lnuC*, *mefA*, *vat*) и аминогликозидам (*aph(3)*, *aph(6)-Id*, *aph(3’)-Ib*, *ant(6)*), составлявшим большую часть резистоста “пастбищных” животных, а также АРГ к хлорамфениколу (*catA*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе мы охарактеризовали состав микробных сообществ и резистом ЖКТ галловейского КРС, яков и “стойлового” КРС из разных регионов России и Казахстана. Ранее проведенные исследования показали, что Firmicutes и Bacteroidota – доминирующие филумы бактерий в рубце КРС, причем относительная численность Firmicutes обычно больше у животных, получающих преимущественно травянистые корма, тогда как доля Bacteroidota возрастает при использовании крахмалсодержащих комбикормов [25, 26]. Большая доля Firmicutes и меньшая доля Bacteroidota у галловейского КРС по сравнению со “стойловым”, вероятно, связана с типом их рациона. Большую часть рациона пастбищных животных составляют дикорастущие растения как в летний, так и в зимний период. И яки, и галловейский КРС круглогодично пасутся на естественных, часто высокогорных лугах. Галловейский КРС в зимний период получает подкормку сеном, полученным из растений с местных лугов. В отличие от пастбищных животных, “стойловые” получали подкормку дробленным зерном (ячмень) и минералами. Метаногенные археи составляли заметную часть микробиоты ЖКТ у галловейского КРС и яков, что, по-видимому, связано с богатым целлюлозой рационом. М. Ророва с соавт. [27] показали, что коровы, получавшие корм на основе клетчатки, имели большее α -разнообразие метаногенов, чем те, рацион которых был богат крахмалом. Богатый травами рацион представлен и более широким спектром субстратов для метаногенов, что приводит к их большей численности и разнообразию [28].

Метагеномный анализ позволяет не только выявить набор генов, имеющих в микробиоте, но и собрать геномы микроорганизмов-членов сообщества. Одной из целей работы было выяв-

ление штаммов с множественной антибиотикорезистентностью. Хотя большинство контигов, содержащих АРГ, имели короткую длину и не были отнесены к определенному MAG, один ген, представляющий *Treponema bryantii*, содержал гены устойчивости к аминогликозидам, тетрациклинам и макролидам. Из работы С. Zhao и др. [29] известно, что относительная численность бактерий рода *Treponema* коррелирует с содержанием *tetX* и других генов устойчивости к тетрациклинам (*tetC*, *tetG*, *tetO* и *tetI*). В исследованных нами образцах средняя доля *Treponema* в микробиомах “стойловых” животных была в несколько раз выше, чем у галловейского КРС и яков (1.40, 0.30 и 0.23% соответственно), как и представленность генов устойчивости к тетрациклинам. Ранее сообщалось, что в хозяйстве, интенсивно применявшем противомикробные препараты, образцы фекалий КРС были обогащены представителями рода *Treponema* [30].

По относительному содержанию АРГ, т.е. доле резистоста в полном метагеноме, исследованные животные четко разделяются на две группы в соответствии с условиями содержания, а не видовой принадлежностью: “пастбищные” (галловейская порода КРС и яки) и “стойловые”. Во всех образцах второй группы доля резистоста в метагеноме (нормированная на содержание генов 16S рРНК) выше, чем у любого из пастбищных животных, а в среднем этот показатель отличался примерно на порядок. Вероятная причина этого – присутствие антибиотиков в составе кормовых добавок, применяемых на фермах. Интересно отметить, что содержание АРГ в группе “стойловых” животных сильно отличалось (рис. 3). Максимальное содержание АРГ обнаружено у молодых животных, чей возраст не превышал одного года (КА0050 и КА0076). Количество АРГ было высоким у телят (возраст до одного года), как разводимых в частных хозяйствах, так и на фермах с более высоким поголовьем в коровниках. По всей видимости, телята получают большую дозу антибиотиков через пищу – в связи со специальным прикормом молоком и комбикормом.

Несмотря на большие различия в общем содержании АРГ, гены устойчивости ко всем основным классам антибиотиков обнаружены как у “пастбищных”, так и у “стойловых” животных (за исключением устойчивости к тетрациклину у яков). Поскольку антибиотики и резистентность к ним встречаются в природе, резистом у “пастбищных” животных, по-видимому, отражает естественный фоновый уровень антибиотикорезистентности микробиоты ЖКТ у КРС.

По сравнению с “пастбищными” животными у “стойловой” группы содержание АРГ к МЛС-антибиотикам, аминогликозидам, гликопептидам и фениколам оказалось выше в 2–4

раза, а к β -лактамам и тетрациклинам — в 24 и 60 раз соответственно. При этом гены устойчивости к β -лактамам и тетрациклинам доминировали в резистоме “стойловой” группы, в то время как в “пастбищной” преобладала устойчивость к МЛС-антибиотикам, аминогликозидам и гликопептидам. По-видимому, АРГ к этим классам антибиотиков представляют естественный фоновый резистом, а широкое распространение устойчивости к β -лактамам и тетрациклинам в “стойловой” группе отражает активное использование этих антибиотиков в животноводстве. Известно, что бактерии “приобретают” АРГ в основном путем горизонтального переноса. Однако известна и внутренняя резистентность (intrinsic resistance) бактерий к противомикробным препаратам. P. Sornplang с соавт. [31] проанализировали чувствительность 93 штаммов *Lactobacillus*, выделенных из фекалий людей и сельскохозяйственных животных, к 7 антибиотикам, а именно: к пенициллину G, амоксициллин-клавулановой кислоте, ванкомицину, тетрациклину, стрептомицину, цiproфлоксацину и сульфаметоксазол-триметоприму. Более 50% штаммов *Lactobacillus* обладали внутренней устойчивостью к ванкомицину, стрептомицину, цiproфлоксацину и сульфаметоксазол-триметоприму. Известно, что для многих энтерококков, например *Enterococcus gallinarum* и *E. casseliflavus/flavescens*, устойчивость к ванкомицину является внутренней резистентностью [32, 33]. Обнаруженные нами в микробиомах пастбищных животных гены *vanT*, *vanR*, *vanG* также, вероятно, определяют внутреннюю устойчивость к ванкомицину.

Недавно W. Wang и др. [9] представили результаты метагеномного анализа образцов фекалий яков, овец, свиней и лошадей, которых содержали в условиях свободного выпаса и в условиях интенсивного выращивания (>10000 голов). Ими показано, что у второй группы животных более разнообразный репертуар АРГ и повышена частота встречаемости резистентных штаммов, причем эти показатели коррелировали. Кроме того, в микробиомах животных в условиях интенсивного выращивания АРГ с большей частотой были ассоциированы с мобильными элементами, а также наблюдалось увеличение численности штаммов с МЛУ [9].

Таким образом, относительно малые доли резистомы в микробиомах фекалий исследованных нами коров и яков, находящихся на свободном выпасе, отражают отсутствие селективного давления, связанного с применением антибактериальных препаратов в составе кормов.

База данных NCBI Reference Gene Catalog содержит 54 семейства генов устойчивости к тетрациклинам (*ter**) и 14 семейств генов *bla* (β -лактамазы класса А и металл- β -лактамазы). Тетрациклины — это антибиотики широкого спектра действия, используемые для профилактики или лечения раз-

личных бактериальных инфекций человека и животных. На молочных предприятиях США для борьбы с бактериальными заболеваниями молочного скота в первую очередь используют β -лактамы и тетрациклиновые антибиотики. Антибиотики, устойчивые к ним бактерии и АРГ обнаруживают в фекалиях КРС, что может способствовать распространению антибиотикорезистентности. Хотя β -лактамы редко находят в навозе КРС, тетрациклины, более устойчивые к деградации в ЖКТ, встречаются часто. Мировая практика использования тетрациклиновых антибиотиков в животноводстве очень широкая. Например, на свиноводческих предприятиях тетрациклины применяют широко и большинство детектируемых АРГ в свином навозе относится именно к *tet*-генам [34–36]. Вторыми и третьими по численности были гены устойчивости к сульфаниламидам, которые также используют в кормовых добавках, и бета-лактамам. Показано, что в формировании резистомы микробиоты ЖКТ сельскохозяйственных животных во многих странах основная роль принадлежит АРГ, придающим устойчивость к тетрациклинам и β -лактамам [37–40].

Полученные нами данные о высокой, по сравнению с “пастбищными” животными, представленности генов устойчивости к тетрациклинам и β -лактамам в микробиомах фекалий “стойловых” коров из фермерских хозяйств России — свидетельство активного использования этих противомикробных препаратов в отечественном животноводстве. Однако информация о применении антибиотиков в конкретных животноводческих хозяйствах практически недоступна. Метагеномный анализ фекалий сельскохозяйственных животных может быть использован для количественного определения генов антибиотикорезистентности для мониторинга применяемых при содержании животных антибиотиков. Более простым вариантом тестирования может быть количественное определение методом ПЦР генов *tetW*, *tetQ*, *bla* и *cfxA*, содержание которых резко отличается у животных отгонно-пастбищного выпаса и стойлового содержания.

Мы признательны Мирону Чунову за предоставление возможности отбора проб фекалий яков и Николаю Нечипоренко за помощь с отбором проб фекалий галловейской породы крупного рогатого скота.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ferri M., Ranucci E., Romagnoli P., Giaccone V. (2017) Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**(13), 2857–2876.
- Poirel L., Madec J.Y., Lupo A., Schink A.K., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S. (2018) Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **6**(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>
- Shrestha P., Cooper B.S., Coast J., Oppong R., Do Thi Thuy N., Phodha T., Celhay O., Guerin P.J., Wertheim H., Lubell Y. (2018) Enumerating the economic cost of antimicrobial resistance per antibiotic consumed to inform the evaluation of interventions affecting their use. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **7**, 98.
- Van Boeckel T.P., Glennon E.E., Chen D., Gilbert M., Robinson T.P., Grenfell B.T., Levin S.A., Bonhoeffer S., Laxminarayan R. (2017) Reducing antimicrobial use in food animals. *Science.* **357**, 1350–1352.
- Mendelsohn E., Ross N., Zambrana-Torrel C., Van Boeckel T.P., Laxminarayan R., Daszak P. (2023) Global patterns and correlates in the emergence of antimicrobial resistance in humans. *Proc. Biol. Sci.* **290**, 20231085.
- Xu Q., Qiao Q., Gao Y., Hou J., Hu M., Du Y., Zhao K., Li X. (2021) Gut microbiota and their role in health and metabolic disease of dairy cow. *Front. Nutr.* **8**, 701511.
- Lim S.K., Kim D., Moon D.C., Cho Y., Rho M. (2020) Antibiotic resistomes discovered in the gut microbiomes of Korean swine and cattle. *Gigascience.* **9**, giaa043.
- Zhu Z., Cao M., Wang W., Zhang L., Ma T., Liu G., Zhang Y., Shang Z., Chen X., Shi Y., Zhang J. (2020) Exploring the prevalence and distribution patterns of antibiotic resistance genes in bovine gut microbiota using a metagenomic approach. *Microb. Drug Resist.* **27**, 980–990.
- Wang W., Wei X., Wu L., Shang X., Cheng F., Li B., Zhou X., Zhang J. (2023) The occurrence of antibiotic resistance genes in the microbiota of yak, beef and dairy cattle characterized by a metagenomic approach. *J. Antibiot. (Tokyo).* **74**, 508–518.
- Begmatov S., Beletsky A.V., Gruzdev E.V., Mardanov A.V., Glukhova L.B., Karnachuk O.V., Ravin N.V. (2022) Distribution patterns of antibiotic resistance genes and their bacterial hosts in a manure lagoon of a large-scale swine finishing facility. *Microorganisms.* **10**(11), 2301.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. (2016) Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**(3), fiw018.
- Magoc T., Salzberg S. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* **27**, 2957–2963.
- Edgar R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* **26**, 2460–2461.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* **4**, 2584.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**(Database issue), D590–6.
- Martin M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* **1**, 10–12.
- Li D., Luo R., Liu C.M., Leung C.M., Ting H.F., Sadakane K., Yamashita H., Lam T.W. (2016) MEGAHIT v1.0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods.* **102**, 3–11.
- Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z. (2019) MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ.* **7**, e7359.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* **25**, 1043–1055.
- Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. (2019) GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics.* **36**, 1925–1927.
- Parks D.H., Chuvochina M., Chaumeil P.A., Rinke C., Mussig A.J., Hugenholtz P. (2020) A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1079–1086.
- Langmead B., Salzberg S. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* **9**, 357–359.
- Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F., Land M.L., Larimer F.W., Hauser L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics.* **11**, 119.
- Feldgarden M., Brover V., Gonzalez-Escalona N., Frye J.G., Haendiges J., Haft D.H., Hoffmann M., Pettengill J.B., Prasad A.B., Tillman G.E., Tyson G.H., Klimke W. (2021) AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci. Rep.* **11**, 12728.
- Fernando S.C., Purvis H., Najar F., Sukharnikov L., Krehbiel C., Nagaraja T., Roe B., DeSilva U. (2010) Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7482–7490.
- McCann J.C., Luan S., Cardoso F.C., Derakhshani H., Khafipour E., Looor J.J. (2016) Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium. *Front. Microbiol.* **7**, 701.

27. Popova M., Martin C., Eugène M., Mialon M.M., Doreau M., Morgavi D.P. (2011) Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* **166–167**, 113–121.
28. Clemmons B.A., Voy B.H., Myer P.R. (2019) Altering the gut microbiome of cattle: considerations of host-microbiome interactions for persistent microbiome manipulation. *Microb. Ecol.* **77**, 523–536.
29. Zhao C., Liu X., Tan H., Bian Y., Khalid M., Sinkkonen A., Jumpponen A., Rahman S.U., Du B., Hui N. (2024) Urbanization influences the indoor transfer of airborne antibiotic resistance genes, which has a seasonally dependent pattern. *Environ. Int.* **185**, 108545.
30. Lee C., Zaheer R., Munns K., Holman D.B., Van Domselaar G., Zovoilis A., McAllister T.A. (2023) Effect of antimicrobial use in conventional versus natural cattle feedlots on the microbiome and resistome. *Microorganisms.* **11**, 2982.
31. Sornplang P., Sakulsawasdiphon K., Piyadeatsoontorn S., Surasorn B. (2016) Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from human and food-producing animal feces in Khon Kaen Province, Thailand. *Trop. Anim. Health Prod.* **48**, 1739–1745.
32. Monticelli J., Knezevich A., Luzzati R., Di Bella S. (2018) Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. *J. Infect. Chemother.* **24**, 237–246.
33. Rubinstein E., Keynan Y. (2013) Vancomycin-resistant enterococci. *Crit. Care Clin.* **29**, 841–852.
34. Zhu Y.G., Johnson T.A., Su J.Q., Qiao M., Guo G.X., Stedtfield R.D., Hashsham S.A., Tiedje J.M. (2013) Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 3435–3440.
35. Li L., Xiao Y., Olsen R.H., Wang C., Meng H., Shi L. (2022) Short- and long-read metagenomics insight into the genetic contexts and hosts of mobile antibiotic resistance in Chinese swine farms. *Sci. Total Environ.* **827**, 154352.
36. Zhang J., Lu T., Chai Y., Sui Q., Shen P., Wei Y. (2019) Which animal type contributes the most to the emission of antibiotic resistance genes in large-scale swine farms in China? *Sci. Total Environ.* **658**, 152–159.
37. Rabello R.F., Bonelli R.R., Penna B.A., Albuquerque J.P., Souza R.M., Cerqueira A.M.F. (2020) Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: an update overview. *Animals (Basel)*. **10**, 552.
38. Collis R.M., Burgess S.A., Biggs P.J., Midwinter A.C., French N.P., Toombs-Ruane L., Cookson A.L. (2019) Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in dairy farm environments: a New Zealand perspective. *Foodborne Pathog. Dis.* **16**, 5–22.
39. Figueiredo R., Henriques A., Sereno R., Mendonça N., da Silva G.J. (2015) Antimicrobial resistance and extended-spectrum β -lactamases of *Salmonella enterica* serotypes isolated from livestock and processed food in Portugal: an update. *Foodborne Pathog. Dis.* **12**, 110–117.
40. Van Boeckel T.P., Pires J., Silvester R., Zhao C., Song J., Criscuolo N.G., Gilbert M., Bonhoeffer S., Laxminarayan R. (2019) Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science.* **365**, eaaw1944.

Antibiotic Resistance Genes in Cattle Gut Microbiota: Influence of Housing Conditions

Sh. A. Begmatov^{1, *}, A. V. Beletsky¹, A. L. Rakitin¹, A. P. Lukina²,
L. O. Sokolyanskaya², A. V. Rakitin², L. B. Glukhova², A. V. Mardanov¹,
O. V. Karnachuk², N. V. Ravin¹

¹Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: shabegmatov@gmail.com

Resistance to antimicrobial drugs is an urgent problem not only in public health, but also in animal husbandry. The widespread use of antimicrobials in feed additives is one of the main reasons for the rapid spread of antibiotic resistance in the microbiota of the gastrointestinal tract of farm animals. To characterize antibiotic resistance genes (resistome), we performed metagenomic analysis of feces of 24 cattle from different regions of Russia, including cows of different breeds and yaks. Animals differed in the type of housing: year-round on pastures or in barns of conventional farms, with consumption of feed additives. Although genes of resistance to aminoglycosides, β -lactams, glycopeptides, MLS antibiotics (macrolides, lincosamides and streptogramins), phenicols and tetracyclines were detected in samples from both groups of animals, the content of resistome in the fecal microbiome of stall-bred cattle was about 10 times higher than in animals kept on pastures. The resistome of stall cattle was dominated by β -lactamases and tetracycline resistance genes, whose content in the microbiome was 24 and 60 times higher, respectively, than in animals kept on pastures. Apparently, the spread of resistance to β -lactams and tetracyclines in stall cattle reflects the active use of these antibiotics in livestock production. Metagenomic analysis of livestock feces can be used to quantify antibiotic resistance genes for the purpose of monitoring antimicrobial drugs used in animal husbandry.

Keywords: cattle, animal husbandry, antibiotics, antibiotic resistance, metagenomics, microbiome, yaks, cows

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПРОДУЦЕНТОВ β -ЛАКТАМАЗ СРЕДИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ ХИРУРГИЧЕСКОГО И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

© 2024 г. С. Ю. Мещурова^{a, *}, А. Г. Коробова^{a, b}, Л. М. Самоходская^{a, b}

^aФакультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия

^bМедицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: svetlana.meschurova@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2024 г.

После доработки 10.06.2024 г.

Принята к публикации 21.06.2024 г.

Назначение адекватной эмпирической терапии требует проведения локального мониторинга распространения резистентных к антибиотикам бактерий в каждом стационаре. Целью работы было сравнение частоты встречаемости энтеробактерий (Enterobacterales) с продукцией β -лактамаз у пациентов отделений терапевтического и хирургического профиля. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. Продукцию β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) подтверждали методом “двойных дисков”, карбапенемаз – модифицированным методом инактивации карбапенемов. Наличие генов карбапенемаз и их экспрессию определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени и иммунохроматографическим методом. Среди выделенных энтеробактерий больше трети продуцировали БЛРС как в отделениях терапевтического профиля (35.51%), так и хирургического (39.85%). Доля продуцентов карбапенемаз была сопоставима в обеих группах и составила 8.41% и 9.77% соответственно. В хирургических отделениях преобладали металло- β -лактамазы, а в терапевтических – сериновые. Среди внебольничных энтеробактерий продуценты β -лактамаз выделяли реже, чем среди нозокомиальных – как в терапевтических (31.48% и 56.6%), так и в хирургических отделениях (45.45% и 51%), но без статистически значимых различий. За три года исследования нами не выявлено увеличения доли продуцентов β -лактамаз в хирургических и терапевтических отделениях стационара, но, безусловно, проведение локального мониторинга необходимо продолжать – с целью выработки локальной стратегии рационального применения антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: β -лактамазы расширенного спектра, карбапенемазы, Enterobacterales, эпидемиологический мониторинг

DOI: 10.31857/S0026898424060115, **EDN:** IAJXDD

ВВЕДЕНИЕ

По данным российских и международных многоцентровых исследований бактерии порядка Enterobacterales занимают лидирующую позицию среди возбудителей инфекций у пациентов стационаров [1] (см. также <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2022-data>, дата обращения 16.04.2024), а продукция β -лактамаз относится к наиболее распространенным механизмам ре-

зистентности и, как следствие, неэффективности β -лактамов в клинической практике. Эффективными в отношении продуцентов β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз остаются лишь отдельные группы антибиотиков, в связи с чем проблема распространения энтеробактерий, продуцирующих β -лактамазы, сохраняет актуальность как в России, так и за рубежом. Наиболее распространены продуценты β -лактамаз среди возбудителей внутрибольничных ин-

фекций у пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), чему посвящена большая часть исследований по этой тематике. По данным разных авторов, доля продуцентов БЛРС в ОРИТ составляет 15–90%, а продуцентов карбапенемаз – 1–17% [2] (см. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-2019>, дата обращения 16.04.2024). Совсем немного публикаций по исследованию продуцентов β -лактамаз вне ОРИТ, хотя для выбора схемы антибактериальной терапии в стенах стационара необходимо знать результаты локального мониторинга распространенности и специфичности антибиотикорезистентности в каждом отделении стационара [3].

Цель работы – сравнить частоту встречаемости энтеробактерий с продукцией β -лактамаз у пациентов отделений терапевтического и хирургического профиля.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование проведено на базе Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М. В. Ломоносова (МНОЦ МГУ) в период 2021–2023 гг. В ретроспективное исследование включено 152 изолята Enterobacterales (далее: изоляты) от 121 пациента, находившегося на стационарном лечении в отделениях терапевтического профиля, и 250 изолятов от 156 пациентов отделений хирургического профиля МНОЦ МГУ. Распределение изолятов от пациентов различных отделений стационара, представлено

Таблица 1. Клинические образцы, полученные от инфицированных пациентов различных отделений стационара

Отделение стационара	Изоляты	
	число	%
Отделения терапевтического профиля		
Нефрология	38	35.51
Терапия	29	27.10
Неврология	23	21.50
Кардиология	14	13.08
Эндокринология	3	2.80
Отделения хирургического профиля		
Абдоминальная хирургия	80	60.15
Урология	40	30.08
Гинекология	10	7.52
Нейрохирургия	1	0.75
Пластическая хирургия	1	0.75
Травматология и ортопедия	1	0.75

в табл. 1. Все изоляты были получены из биоматериала пациентов с симптомами инфекции соответствующей локализации.

Распределение изолятов, полученных из различного биоматериала пациентов, представлено в табл. 2. Тип инфекции у пациента (внебольничная, нозокомиальная) определяли по времени возникновения, согласно формальному критерию Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для нозокомиальных инфекций [4]. Нозокомиальной считали инфекцию, которую диагностировали у пациента не менее чем через 48 ч после госпитализации, при условии, что она отсутствовала у него до поступления в медицинское учреждение, даже в инкубационном периоде, а появилась только в медицинском учреждении. Медиана возраста пациентов, от которых были получены клинические образцы, составляла 73 (22–100) и 61 (21–86) год для пациентов отделений терапевтического и хирургического профиля соответственно ($p < 0.05$). Среди пациентов с инфекцией в отделениях терапевтического профиля преобладали женщины (58.55%), а в отделениях хирургического профиля – мужчины (60.80%).

Идентификация микроорганизмов. Видовую принадлежность изолятов микроорганизмов определяли методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) на анализаторе VITEK MS (“bioMerieux”, Франция) в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения VITEK MS. Критерием надежной видовой идентификации считали уровень достоверности 99.9%.

Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам. Определение чувствительности к антимикробным препаратам проводили диско-диффузионным методом с использованием агара Мюллера-Хинтон (“Oxoid”, Великобритания) и дисков с антибиотиками (“MAST Group Ltd.”, Великобритания, и “Bioanalyse”, Турция), а также с помощью автоматического анализатора VITEK2-compact (“bioMerieux”). Определение клинических категорий чувствительности изолятов к антибиотикам проводили на основании пограничных значений в соответствии с рекомендациями EUCAST 2023 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) и российскими рекомендациями “Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021)” (https://www.eucast.org/clinical_breakpoints, дата обращения 16.04.2024; <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations/>, дата обращения 16.04.2024). При характеристике результатов чувствительности бактерий использовали следующие понятия: чувствительные (S), чув-

Таблица 2. Клинические образцы в соответствии с локализацией инфекции у пациента и видом полученного биоматериала

Клинический материал	Изоляты ^а	
	ОТП, n (%)	ОХП, n (%)
Мочевыводящая система		
Моча	96 (89.72)	49 (36.84)
Кровь (уросепсис)	1 (0.93)	2 (1.50)
Раневое отделяемое мочевыводящей системы	0	4 (3.01)
Биоптат мочевыводящих путей	0	1 (0.75)
Дыхательная система		
Мокрота	7 (6.54)	0
Плевральная жидкость	0	2 (1.50)
Брюшная полость		
Перитонеальная жидкость	0	19 (14.28)
Раневое отделяемое брюшной полости	0	40 (30.08)
Содержимое абсцесса брюшной полости	0	7 (5.26)
Желчь	0	1 (0.75)
Кровь (генерализация инфекции)	0	1 (0.75)
Другое		
Раневое отделяемое кожи и мягких тканей	2 (1.87)	6 (4.51)
Кровь (катетер-ассоциированная инфекция кровотока)	1 (0.93)	0
Отделяемое половых органов	0	1 (0.75)

^аОТП – отделения терапевтического профиля; ОХП – отделения хирургического профиля (в таблицах здесь и далее).

ствительные при увеличенной экспозиции (I), резистентные (R). Для амоксициллина/клавулановой кислоты использовали критерии для внутривенного введения.

Выявление механизмов устойчивости к β -лактамам антибиотикам. Для подтверждения продукции БЛРС использовали рекомендованные EUCAST фенотипические методы (см. https://www.eucast.org/resistance_mechanisms, дата обращения 16.04.2024), основанные на подавлении активности БЛРС клавулановой кислотой *in vitro*, а именно метод “двойных дисков” или модифицированный метод разведений в бульоне, используемый в автоматизированной системе определения чувствительности VITEK2-compat.

Для выявления продукции приобретенных β -лактамаз класса C по Ambler (AmpC) у *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* проводили дополнительные исследования. Определяли чувствительность к цефепиму (цефалоспорины IV поколения). Если продукция БЛРС у энтеробактерий не была определена методом “двойных дисков”, а выделенный

изолят имел устойчивость хотя бы к одному из цефалоспоринов III поколения и был чувствителен к цефепиму, то дополнительно исследовали чувствительность к цефокситину. Энтеробактерии, устойчивые к цефокситину, амоксициллину с клавулановой кислотой и чувствительные к цефепиму, расценивали как возможные продуценты приобретенных AmpC β -лактамаз (см. https://www.eucast.org/resistance_mechanisms, дата обращения 16.04.2024).

Для подтверждения наличия карбапенемаз использовали модифицированный метод инактивации карбапенемов (Modified Carbapenem Inactivation Method, mCIM) (<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>, дата обращения 07.06.2024). Метод основан на выявлении ферментативного гидролиза путем инкубации бактериальной суспензии в присутствии карбапенема. В случае получения сомнительного результата исследования наличие генов карбапенемаз подтверждали молекулярно-генетическими методами.

Детекция генов карбапенемаз. Наличие у Enterobacterales генов наиболее распространен-

ных сериновых карбапенемаз: групп ОХА-48-like¹ и КРС² – и металло-β-лактамаз: групп IMP³, VIM⁴ и NDM⁵ – определяли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческого набора БакРезиста GLA (“ДНК-Технология”, Россия). Также определяли типы карбапенемаз иммунохроматографическим методом с использованием экспресс-теста Carba-5 (“NG Biotech Z.A.”, Франция).

Статистический анализ. Информацию по каждому изоляту вносили в электронную таблицу в формате Excel. Обработку и анализ данных проводили с использованием функций, доступных в Excel, а также онлайн-платформы AMRcloud [3]. Для статистической обработки использовали критерии Манна-Уитни и χ^2 Пирсона, а также точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В спектре энтеробактерий преобладали Escherichia coli и Klebsiella pneumoniae

В спектре возбудителей, выделенных от пациентов отделений терапевтического и хирургического профиля, преобладали предста-

вители порядка Enterobacterales – 70.39% (107 из 152 изолятов) и 53.2% (133 из 250 изолятов) соответственно. Следует отметить, что энтеробактерии детектировали достоверно чаще в образцах из отделений терапевтического профиля ($p < 0.05$). И в терапевтических, и в хирургических отделениях преобладали *E. coli* (58.88 и 51.13% соответственно) и *K. pneumoniae* (27.10 и 24.81% соответственно). Доля видов, продуцирующих хромосомные цефалоспорины AmpC (*Enterobacter cloacae* complex, *Hafnia alvei*, *K. aerogenes*, *Morganella morganii*), составила 4.7 и 13.5% среди изолятов из терапевтических и хирургических отделений. Полный спектр энтеробактерий представлен в табл. 3. При анализе спектров возбудителей инфекций мочевыводящих путей (ИМП) в терапевтических и хирургических отделениях ведущими также были *E. coli* (64.84 и 46.43%) и *K. pneumoniae* (27.47 и 35.71%). Аналогичные виды возбудителей преобладали при интраабдоминальных инфекциях в хирургических отделениях. Так, на долю *E. coli* приходилось 55.07%, а *K. pneumoniae* – 17.39%.

Чувствительность к β-лактамам антибиотикам сопоставима у Enterobacterales, выделенных от пациентов терапевтических и хирургических отделений

В отделениях терапевтического профиля только 16.13% Enterobacterales были чувствительны к незащищенным пенициллинам; доля изолятов, чувствительных к защищенным пенициллинам, была выше и составила 44.09% к амоксициллину с клавулановой кислотой и 80.56% к пиперациллину/тазобактаму. Лишь 52.12% энтеробактерий были чувствительны к цефалоспорином III поколения, в то

¹ОХА-48-like – охациллин-48-подобные; ²КРС – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, карбапенемаза *Klebsiella pneumoniae*; ³IMP – imipenemase, имипенемаза; ⁴VIM – Verona Integron-encoded metallo-β-lactamase, Верона интегронокодированная металло-β-лактамаза; ⁵NDM – New Delhi metallo-β-lactamase, Нью-Дели металло-β-лактамаза.

Таблица 3. Спектр выделенных энтеробактерий и доля продуцентов β-лактамаз

Микроорганизм	ОТП			ОХП		
	Всего	БЛРС, n (%)	Карбапенемазы, n (%)	Всего	БЛРС, n (%)	Карбапенемазы, n (%)
<i>Escherichia coli</i>	63	28 (44.44)	0	68	35 (51.47)	1 (1.47)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	8 (27.58)	9 (31.03)	33	10 (30.3)	11 (33.33%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	0	0	1	0	0
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	0	0	1	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	5	1 (20)	0	12	5 (41.67)	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	4	1 (25)	0	13	3 (23.07)	1 (7.69)
<i>Morganella morganii</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0	0	1	0	0
<i>Citrobacter youngae</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	0	0	1	0	0
Всего	107	38 (35.51)	9 (8.41)	133	53 (39.85)	13 (9.77)

время как защищенные цефалоспорины (цефтазидим/авибактам) были эффективны в отношении 95.24% изолятов. К меропенему были чувствительны 89.69% Enterobacterales, причем эффективность в отношении *E. coli* составила 100%, а в отношении *K. pneumoniae* – 66.67%. Результаты оценки чувствительности Enterobacterales к антимикробным препаратам представлены на рис. 1.

В отношении энтеробактерий, выделенных от пациентов отделений хирургического профиля, β-лактамы антибиотики были менее ак-

тивны, однако статистически значимых различий не выявлено: к ампициллину чувствительны были 8.74%, к амоксициллину с клавулановой кислотой 34.82%, к пиперациллину/тазобактаму 64.71%, к цефотаксиму 47.86%, к меропенему 86.77%, к цефтазидиму/авибактаму 91.34% изолятов. Чувствительность к меропенему была ниже среди *K. pneumoniae* (56.66%) по сравнению с *E. coli* (96.72%; $p < 0.05$). Результаты оценки чувствительности Enterobacterales к антимикробным препаратам представлены на рис. 2.

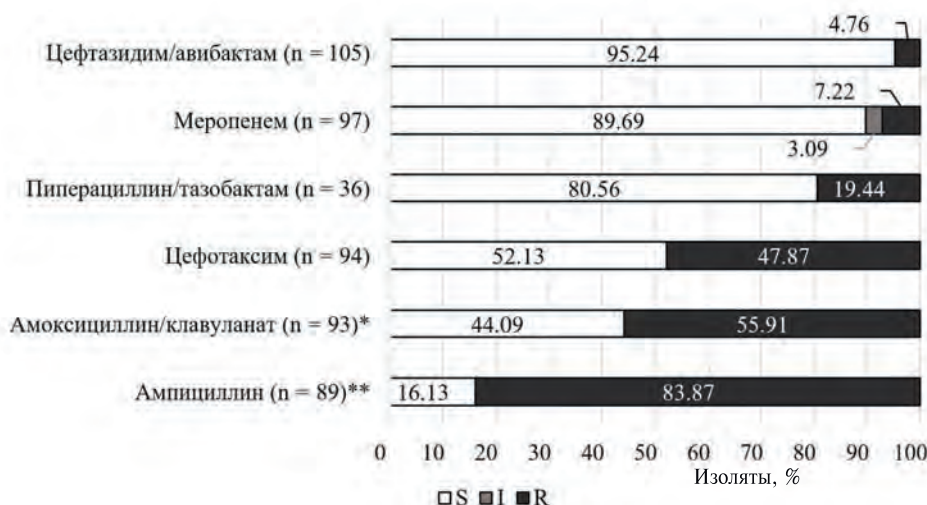


Рис. 1. Чувствительность к антибактериальным препаратам Enterobacterales, выделенных в терапевтических отделениях. Обозначения: *среди них идентифицировано 5 изолятов, продуцирующих хромосомные цефалоспорины AmpC (*E. cloacae* complex – 4, *K. aerogenes* – 1); **среди них – 35 изолятов, продуцирующих хромосомные цефалоспорины AmpC и β-лактамазы широкого спектра (*K. pneumoniae* – 29, *E. cloacae* complex – 4, *K. aerogenes* – 1, *K. oxytoca* – 1); S – чувствительные, I – чувствительные при увеличенной экспозиции, R – резистентные бактерии.

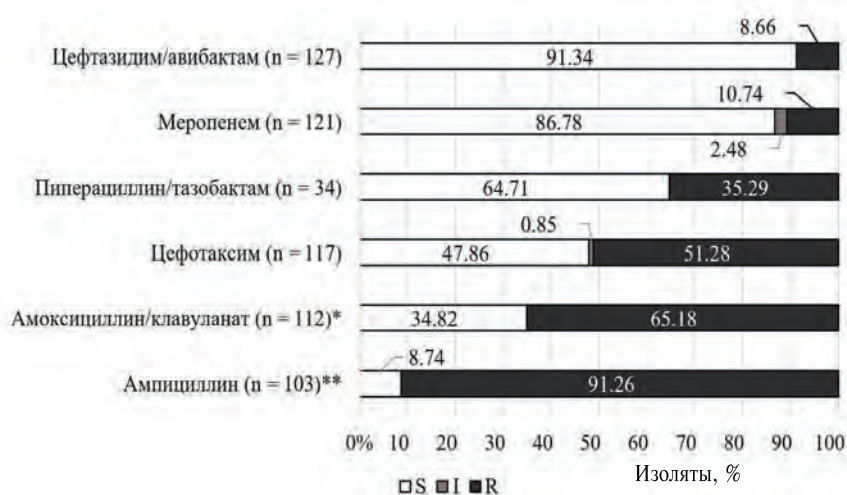


Рис. 2. Чувствительность к антибактериальным препаратам Enterobacterales, выделенных в хирургических отделениях. Обозначения: *среди них идентифицировано 17 изолятов, продуцирующих хромосомные цефалоспорины AmpC (*E. cloacae* complex – 13, *M. morgani* – 2, *K. aerogenes* – 1, *H. alvei* – 1); **среди них – 52 изолята, продуцирующих хромосомные цефалоспорины AmpC и β-лактамазы широкого спектра (*K. pneumoniae* – 33, *E. cloacae* complex – 13, *M. morgani* – 2, *K. aerogenes* – 1, *K. oxytoca* – 1, *H. alvei* – 1, *C. koseri* – 1).

Доля продуцентов БЛРС и карбапенемаз сопоставима у энтеробактерий, выделенных в терапевтических и хирургических отделениях

Распределение продукции приобретенных β -лактамаз среди Enterobacterales в терапевтических отделениях представлено в табл. 4. Среди энтеробактерий отделений терапевтического профиля доля продуцентов БЛРС составила 35.51%, причем 39.47% из них были выделены уже при поступлении в стационар. Большинство продуцентов БЛРС (92.11%) было выделено из мочи (27 *E. coli*, 7 *K. pneumoniae*, 1 *P. mirabilis*) и только 3 – из мокроты (1 *E. coli*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *E. cloacae* complex). Доля продуцентов БЛРС среди возбудителей нозокомиальных инфекций составила 43.4%, а среди внебольничных – 27.78% ($p > 0.05$). Среди резистентных к цефалоспорином энтеробактерий 73.33% были продуцентами БЛРС, 17.78% – карбапенемаз, 4.44% – хромосомных и плазмидных AmpC. Доля продуцентов БЛРС среди *E. coli* составила 44.44%, изоляты *E. coli* с продукцией БЛРС были чувствительны к амоксициллину с клавулановой кислотой *in vitro* лишь в 29.17% случаев, к пиперациллину/тазобактаму – в 85.71%. Продукция БЛРС встречалась у *K. pneumoniae* в 27.58% случаев, однако статистически значимых отличий от *E. coli* выявлено не было ($p > 0.05$), чувствительными к амоксициллину

с клавулановой кислотой были 16.67% изолятов. Все изоляты Enterobacterales с продукцией БЛРС были чувствительны к цефтазидиму/авибактаму.

Доля продуцентов карбапенемаз в терапевтических отделениях составила 8.41%, из них 22.22% ($n = 2$) вызвали внебольничную инфекцию. Продукция карбапенемаз была выявлена только для *K. pneumoniae*. Большая часть (66.67%, $n = 6$) продуцентов карбапенемаз выделена из мочи, один изолят получен из крови при уросепсисе, также по одному изоляту были возбудителями катетер-ассоциированной инфекции кровотока и пневмонии. Среди возбудителей нозокомиальных инфекций продуцентами карбапенемаз было 13.21% энтеробактерий, среди возбудителей внебольничных инфекций – 3.7% ($p > 0.05$). Все 7 резистентных к меропенему изолятов, а также два из трех чувствительных при повышенной экспозиции были продуцентами карбапенемаз. Цефтазидим/авибактам обладал активностью *in vitro* в отношении 55.59% Enterobacterales с продукцией карбапенемаз.

Преобладали сериновые карбапенемазы изолированно или в комбинации (33.33% OXA-48, 11.11% KPC, 11.11% OXA-48 + KPC). Металло- β -лактамазы типа NDM изолировано и в комбинации сериновыми карбапенемазами обнаружены в 44.44% случаев. Распределение карбапенемаз представлено на рис. 3а.

Таблица 4. Распределение продукции приобретенных β -лактамаз среди Enterobacterales в терапевтических отделениях

Продукция β -лактамаз	Внебольничная инфекция, n (%)	Нозокомиальная инфекция, n (%)	Всего, n (%)
Всего Enterobacterales	54	53	107
БЛРС	15 (27.78%)	23 (43.4%)	38 (35.51%)
Карбапенемазы	2 (3.7%)	7 (13.21%)	9 (8.41%)

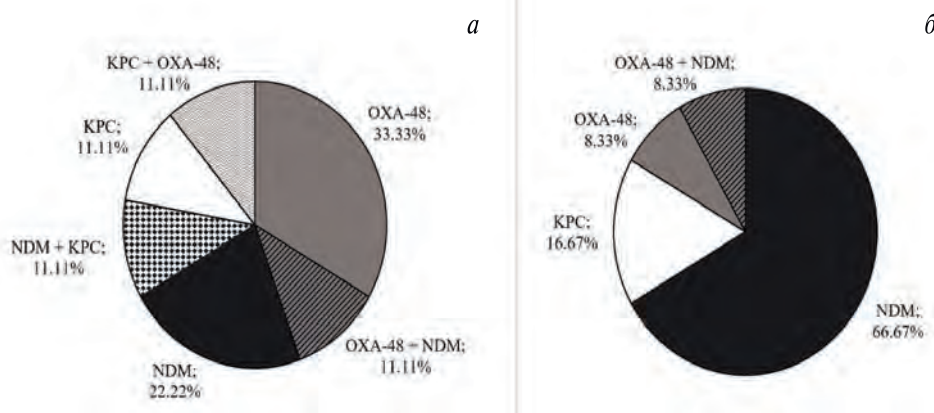


Рис. 3. Типы карбапенемаз у Enterobacterales, выделенных от пациентов терапевтических (а) и хирургических (б) отделений.

Распределение продукции приобретенных β -лактамаз среди Enterobacterales в хирургических отделениях представлено в табл. 5. Сопоставимое количество продуцентов БЛРС было выделено из брюшной полости: 35.85% из раневого отделяемого (12 *E. coli*, 5 *K. pneumoniae*, 1 *P. mirabilis*, 1 *E. cloacae* complex), 11.32% из перитонеальной жидкости (6 *E. coli*), 3.77% из абсцессов (2 *E. coli*) – и из мочевых путей: 37.73% из мочи (12 *E. coli*, 4 *K. pneumoniae*, 3 *P. mirabilis*, 1 *E. cloacae* complex), 1.89% из раневого отделяемого (1 *E. coli*), 1.89% из биоптата (1 *P. mirabilis*), 1.89% из крови при уросепсисе (1 *K. pneumoniae*). Реже их выделяли из ране-

вого материала кожи и мягких тканей (3.77%, 2 *E. coli*) и плевральной жидкости (1.89%, 1 *E. cloacae* complex). Доля продуцентов БЛРС составила 39.85% ($n = 53$), только 18.87% ($n = 10$) из них были выделены при поступлении в стационар. Среди возбудителей нозокомиальных инфекций продуцентами БЛРС было 43% энтеробактерий, среди возбудителей внебольничных инфекций – 30.3% ($p > 0.05$). Большинство резистентных к цефалоспорином энтеробактерий (78.33%) было продуцентами БЛРС, 16.67% – продуцентами карбапенемаз и 5% – продуцентами хромосомных AmpC. Доля продукции БЛРС среди *E. coli* составила 51.47%, *E. coli* с БЛРС были чувствительными к амоксициллину/клавулановой кислоте *in vitro* в 26.67% случаев, к пиперациллину/тазобактаму – в 57.14%. Изоляты *K. pneumoniae* реже были продуцентами БЛРС (30.3%; $p < 0.05$), среди них чувствительными к амоксициллину с клавулановой кислотой *in vitro* были 33.33%, к пиперациллину/тазобактаму – 60%. Эффективность цефтазидима/авибактама в отношении продуцентов БЛРС составляла 100%.

Таблица 5. Распределение продукции приобретенных β -лактамаз среди Enterobacterales в хирургических отделениях

Продукция β -лактамаз	Внебольничная инфекция, n (%)	Нозокомиальная инфекция, n (%)	Всего, n (%)
Всего Enterobacterales	33	100	133
БЛРС	10 (30.3%)	43 (43%)	53 (39.85%)
Карбапенемазы	5 (15.15%)	8 (8%)	13 (9.77%)

вого материала кожи и мягких тканей (3.77%, 2 *E. coli*) и плевральной жидкости (1.89%, 1 *E. cloacae* complex). Доля продуцентов БЛРС составила 39.85% ($n = 53$), только 18.87% ($n = 10$) из них были выделены при поступлении в стационар. Среди возбудителей нозокомиальных инфекций продуцентами БЛРС было 43% энтеробактерий, среди возбудителей внебольничных инфекций – 30.3% ($p > 0.05$). Большинство резистентных к цефалоспорином энтеробактерий (78.33%) было продуцентами БЛРС, 16.67% – продуцентами карбапенемаз и 5% – продуцентами хромосомных AmpC. Доля продукции БЛРС среди *E. coli* составила 51.47%, *E. coli* с БЛРС были чувствительными к амоксициллину/клавулановой кислоте *in vitro* в 26.67% случаев, к пиперациллину/тазобактаму – в 57.14%. Изоляты *K. pneumoniae* реже были продуцентами БЛРС (30.3%; $p < 0.05$), среди них чувствительными к амоксициллину с клавулановой кислотой *in vitro* были 33.33%, к пиперациллину/тазобактаму – 60%. Эффективность цефтазидима/авибактама в отношении продуцентов БЛРС составляла 100%.

Продукция карбапенемаз выявлена в 9.77% ($n = 13$) энтеробактерий, из которых 38.46% ($n = 5$) были выделены от пациентов при поступлении в стационар. Большинство продуцентов карбапенемаз (84.62%, $n = 11$) было выделено из мочи (9 *K. pneumoniae*, 1 *E. coli*, 1 *E. cloacae*

complex) и по одному изоляту *K. pneumoniae* – из перитонеальной жидкости и раневого материала кожи и мягких тканей. Доля продуцентов карбапенемаз среди возбудителей нозокомиальных инфекций составила 8%, а среди внебольничных – 15.15%, хотя различия не были статистически значимыми ($p > 0.05$). Среди 13 резистентных к меропенему энтеробактерий только один изолят не продуцировал карбапенемазы. Среди чувствительных при повышенной экспозиции продуцентом карбапенемаз был один из трех изолятов. Цефтазидим/авибактам был эффективен *in vitro* в отношении 15.38% Enterobacterales с продукцией карбапенемаз.

В спектре энтеробактерий с продукцией карбапенемаз преобладали *K. pneumoniae* ($n = 11$), также выделено по одному изоляту *E. coli* и *E. cloacae* complex с продукцией карбапенемаз типа NDM. У Enterobacterales в хирургических отделениях чаще детектировали металло- β -лактамазы типа NDM (изолировано 61.54%, вместе с OXA-48 7.69%), реже – сериновые карбапенемазы типа KPC (изолировано 15.38%) и OXA-48 (изолировано 7.69%). Для одного изолята *K. pneumoniae* не исследовали гены карбапенемаз. Распределение карбапенемаз представлено на рис. 3б.

При сравнении доли продуцентов БЛРС и карбапенемаз среди энтеробактерий в терапевтических и хирургических отделениях не выявили статистически значимых различий (35.51% против 39.85%, $p > 0.05$; 8.41% против 9.77%, $p > 0.05$ соответственно) (табл. 3). В отделениях хирургического профиля преобладали продуценты металло- β -лактамаз типа NDM (69.23%), тогда как в отделениях терапевтического профиля – сериновых карбапенемаз (55.55%, $p > 0.05$).

Следует отметить, что среди продуцентов карбапенемаз, выделенных при нозокомиальных инфекциях, преобладали NDM металло- β -лактамазы (69.23%), тогда как продукция OXA-48 карбапенемаз в моноварианте обнаружена только у пациентов при поступлении в стационар.

В отделениях хирургического и терапевтического профиля доля энтеробактерий-продуцентов БЛРС и карбапенемаз практически не изменялась в течение трех лет исследования

Статистически значимых изменений в доле продуцентов БЛРС и карбапенемаз за период исследования нами не выявлено ($p > 0.05$) (рис. 4). Однако можно заметить, что доля Enterobacterales с продукцией БЛРС в отделениях терапевтического профиля за три года выросла на 18.26% от исходных 21.74% (достигла 46%), а доля продуцентов карбапенемаз в отделениях хирургического профиля за это время снизилась на 4.83% от исходных 13.16% (до 8.33%).

Среди нозокомиальных изолятов Enterobacterales в разных отделениях стационара процент продуцентов БЛРС был стабильным и находился в пределах 37–50% (рис. 5). Следует отметить резкие изменения доли продуцентов карбапенемаз среди нозокомиальных изолятов Enterobacterales: с 14.29% в 2021 г. до 20.83% в 2022 г. и снижение до 5% в 2023 г., – но эти скачки не были статистически значимыми ($p > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование выполнено в многопрофильном стационаре, при этом в каждом учреждении, осуществляющем медицинскую деятельность, есть особенности видового разнообразия и приобретенной антибиотикорезистентности микроорганизмов, выделяемых от пациентов. Эти особенности зависят от половозрастного состава пациентов, специализации медицин-

ского учреждения, видов медицинской помощи и других условий.

Представители Enterobacterales отличаются друг от друга по спектру природной устойчивости как к β -лактамам, так и к другим группам антибиотиков. Самый широкий спектр природной устойчивости к β -лактамам характерен для энтеробактерий, продуцирующих хромосомные цефалоспорины – AmpC. К таким бактериям относятся *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *H. alvei*, *M. morgani* и некоторые другие (см. www.eucast.org/clinical_breakpoints, дата обращения 16.04.2024). В проведенном нами ретроспективном исследовании на базе многопрофильного стационара МНОЦ МГУ доля продуцентов хромосомных AmpC β -лактамаз составляла 4.7% и 13.5% среди изолятов терапевтических и хирургических отделений соответственно. Распространение приобретенной продукции AmpC β -лактамаз у энтеробактерий не столь значительно, как распространение БЛРС и карбапенемаз. Так, среди изолятов, устойчивых к цефалоспорином III поколения, приобретенные AmpC β -лактамазы обнаружены только в одном изоляте *E. coli* из отделения терапевтического профиля. Назначение пенициллинов, защищенных пенициллинов, а также цефалоспоринов I–III поколения в случае инфекции, вызванной такими возбудителями, будет неэффективным. Вклад в увеличение уровня резистентности к незащищенным пенициллинам также вносят *K. pneumoniae*, которые обладают хромосомными β -лактамазами широкого спектра.

В научной литературе упоминания о выявлении β -лактамаз у бактерий появились еще до

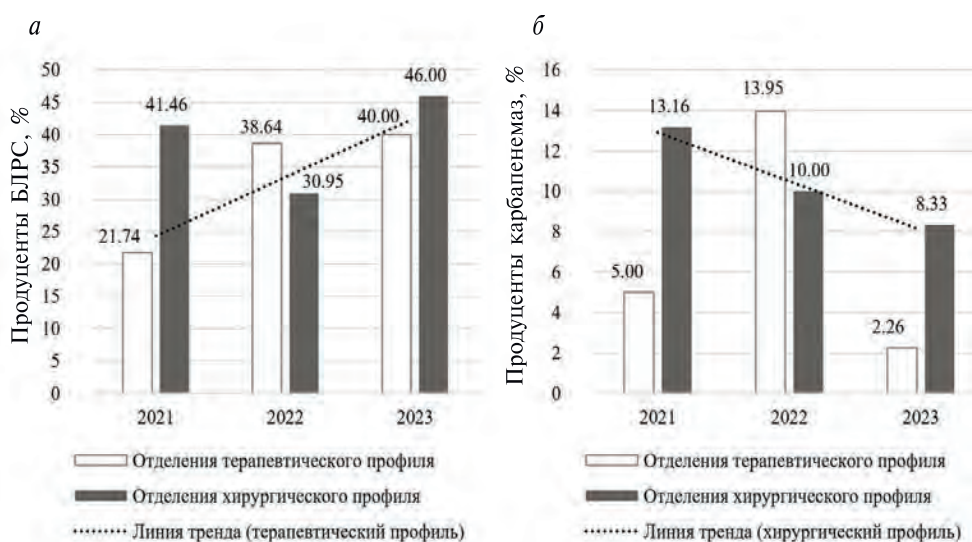


Рис. 4. Динамика изменения доли продуцентов БЛРС (а) и карбапенемаз (б) среди Enterobacterales, выделенных от госпитализированных пациентов, за 2021–2023 гг.

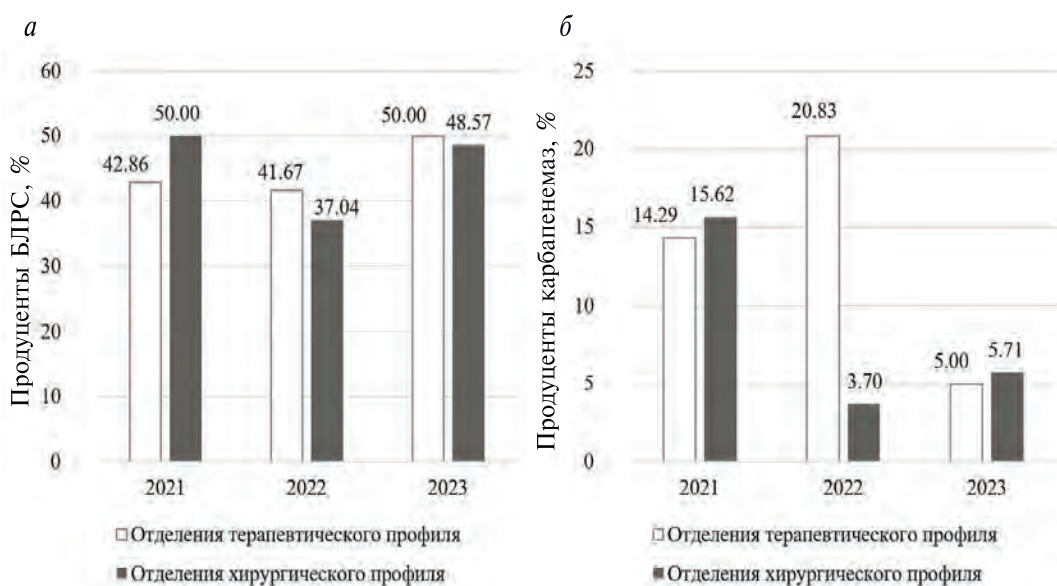


Рис. 5. Динамика изменения доли продуцентов БЛРС (а) и карбапенемаз (б) среди Enterobacterales, выделенных от пациентов с нозокомиальной инфекцией, за 2021–2023 гг.

начала широкого использования β -лактамов антибиотиков в медицине. Однако широкое распространение плазмидных β -лактамаз среди возбудителей инфекций в первую очередь связано с активным использованием β -лактамов в клинической практике. Первые российские эпидемиологические исследования по оценке распространения антибиотикорезистентности были проведены в конце 90-х годов XX века. Уже тогда в ОРИТ доля продуцентов БЛРС среди *K. pneumoniae* была выше 60%, а в начале 2000-х достигла 84.3% [5]. В настоящее время продукция БЛРС распространена не только среди госпитальных изолятов в различных отделениях стационаров, но и среди выделенных от амбулаторных пациентов. Так, в российском многоцентровом исследовании “ДАРМИС-2018” доля продуцентов БЛРС среди бактерий *E. coli*, выделенных от взрослых пациентов с внебольничными ИМП, составила 27% [6]. У пациентов МНОЦ МГУ доля продуцентов БЛРС среди возбудителей внебольничных инфекций составила 27.78% в терапевтических отделениях и 30.3% в хирургических, что согласуется с результатами упомянутого многоцентрового исследования, так как значительная доля проанализированных нами изолятов была выделена от пациентов с ИМП.

Доля продуцентов БЛРС была больше среди возбудителей госпитальных инфекций в терапевтических и хирургических отделениях (43.4% и 43% соответственно) по сравнению с внебольничными (27.78% и 30.3% соответственно). Эти данные согласуются с тенденцией более широ-

кого распространения микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью среди возбудителей нозокомиальных инфекций, отмеченной в многоцентровых исследованиях. Так, среди энтеробактерий-возбудителей внебольничных инфекций, выделенных от пациентов в отделениях терапевтического и хирургического профиля в 2019–2021 гг., устойчивыми к цефтриаксону были 35.5% и 35.6% соответственно, а среди возбудителей госпитальных инфекций – 74% и 71.8% [1].

Таким образом, устойчивость к цефалоспорином III поколения у энтеробактерий может быть связана как с продукцией AmpC, так и с плазмидными БЛРС. Изоляты с продукцией карбапенемаз также обладают устойчивостью к цефалоспорином.

Первые изоляты с продукцией карбапенемаз были зарегистрированы в России в 2006 г. [7], уже к 2016 г. их доля среди энтеробактерий по данным многоцентровых исследований достигла 14.4% [8]. По данным мониторинга, проведенного в период с 2019 г. по 2021 г., карбапенемазопродуцирующие энтеробактерии составляли 21.79% в отделениях терапевтического профиля и 20.17% – хирургического [1]. В стационаре МНОЦ МГУ такие микроорганизмы встречались значительно реже: 8.41 и 9.77% в терапевтических и хирургических отделениях соответственно.

Среди энтеробактерий, выделенных в терапевтических отделениях, при внебольнич-

ных инфекциях доля продуцентов карбапенемаз была ниже, чем при госпитальных (3.7% и 13.21% соответственно), что коррелирует с общей тенденцией распространения продуцентов карбапенемаз в стационарах. Однако в хирургических отделениях отмечено преобладание Enterobacterales с продукцией карбапенемаз среди внебольничных возбудителей по сравнению с госпитальными (15.15% и 8% соответственно), но различия статистически незначимые и могут быть связаны с низкой частотой внебольничных инфекций в хирургических отделениях.

В разных географических регионах мира замечена неоднородность доминирующих типов карбапенемаз у энтеробактерий: в странах Северной и Южной Америки, Италии, Греции преобладают продуценты КРС; в Турции и большинстве регионов России – ОХА-48; в Индии – NDM, в странах Азии и Австралии – IMP [9]. Также есть различия в распространении отдельных типов карбапенемаз внутри страны: на большей части территории России основным типом карбапенемаз является ОХА-48, за исключением Санкт-Петербурга, Мурманска, Челябинска, Улан-Уде и некоторых других городов, где больше половины составляют металлоферменты NDM [1]. В проведенном нами исследовании также замечена неоднородность преобладающих карбапенемаз в разных отделениях стационара. Продуценты карбапенемаз типа NDM преобладали в хирургических отделениях (69.23%), а в отделениях терапевтического профиля чаще выделяли продуценты ОХА-48 (55.55%). Продукцию ОХА-48 в моноварианте детектировали только при поступлении в стационар, что можно объяснить предыдущими случаями госпитализации в другие стационары. По данным мониторинга, проведенного А. Кузьменковым и др. [1], на территории России в 2019–2021 гг., как в отделениях терапии, так и хирургии, преобладали продуценты карбапенемаз типа ОХА-48, их доля относительно общего числа продуцентов карбапенемаз составляла 41.77% и 48.17% соответственно.

Согласно полученным нами данным, в МНОЦ МГУ энтеробактерии были ведущими в спектре возбудителей и в терапевтических, и в хирургических отделениях (70.39% и 53.2% соответственно), что связано с преобладанием образцов из отделений нефрологии, урологии и абдоминальной хирургии и, следовательно, с высокой долей ИМП и интраабдоминальных инфекций относительно общего числа инфекций в стационаре. В видовом составе лидировали *E. coli* и *K. pneumoniae*. Доля продуцентов БЛРС была выше у *E. coli* (44.44% и 51.47%) по сравнению с *K. pneumoniae* (27.58% и 30.3%), тогда как продукцию карбапенемаз детектировали в основном у *K. pneumoniae*

(31.03% и 33.33%). Только один изолят *E. coli* продуцировал карбапенемазу. Другие исследователи получали несколько отличающиеся результаты, что может быть связано с выборкой пациентов и специализацией стационара. Так, А. Ljubović и соавт. [10], изучая только изоляты *K. pneumoniae* (n = 934), большую часть продуцентов БЛРС выделили от пациентов отделений хирургического профиля (30.1%), при этом доля продуцентов БЛРС от общего количества изолятов *K. pneumoniae* составляла 37%, карбапенемаз – 20%. Больше всего карбапенемазпродуцирующих *K. pneumoniae* авторы выделили от пациентов ОРИТ (42%), меньше таких изолятов было в отделениях хирургического профиля (36.7%) и терапевтического (8%). Стоит заметить, что в этом исследовании не приведены данные по распределению изолятов по отделениям, а значит не представляется возможным сравнить долю выделенных продуцентов БЛРС и карбапенемаз в отделениях хирургического и терапевтического профилей. Y. Wang с соавт. [11] сообщали, что среди изолятов *K. pneumoniae* (n = 2774) и *E. coli* (n = 2154) соответственно 15.79% и 36.86% были продуцентами БЛРС. Большая часть продуцентов БЛРС была получена из отделений хирургического профиля, однако доля БЛРС-продуцентов от общего числа изолятов по отделениям не указана. В исследовании показано, что продуценты БЛРС чаще встречаются в группе пациентов старше 60 лет. В исследовании, проведенном С. Митрохиным и др. [12], проанализирована резистентность возбудителей нозокомиальных инфекций в многопрофильном стационаре и показано, что 30% изолятов *E. coli* и 35% *K. pneumoniae* были продуцентами БЛРС, при этом 25% *K. pneumoniae* продуцировали карбапенемазы.

Нами не выявлено статистически значимых изменений доли продуцентов БЛРС и карбапенемаз среди энтеробактерий в течение трех лет (2021–2023 гг.), однако отмечена тенденция к нарастанию количества продуцентов БЛРС среди возбудителей в терапевтических отделениях и снижению доли продуцентов карбапенемаз в хирургических отделениях. В других исследованиях, проведенных в локальных медицинских учреждениях, также не выявлено статистически значимого изменения доли продуцентов БЛРС и карбапенемаз [10, 13]. Однако по данным многоцентровых исследований, проведенных на уровне регионов, замечено увеличение доли продуцентов приобретенных β-лактамаз. Так, исследователи из Китая выявили рост количества БЛРС-продуцирующих бактерий *K. pneumoniae* за период 2013–2017 гг. [11]. По данным российского многоцентрового исследования, в период 2019–2021 гг. в отделениях хирургического профиля доля продуцентов кар-

бапенемаз не изменилась (20.57/17.59/22.18%), тогда как в отделениях терапии отмечался рост количества продуцентов карбапенемаз (13.6/20.8/32.77%) [1].

В проведенном нами исследовании более 90% изолятов в отделениях терапевтического профиля были получены от больных с ИМП, а в отделениях хирургического профиля – 50% от больных с инфекциями брюшной полости и 40% от больных с ИМП. Развитие инфекций при этих заболеваниях часто связано с эндогенным инфицированием микроорганизмами, которые являются нормобиотой кишечника или колонизируют желудочно-кишечный тракт. Так, наиболее частый путь инфицирования мочевых путей – восходящий, обусловленный колонизацией кожи промежности микроорганизмами и последующим их проникновением в уретру и мочевой пузырь, а при наличии пузырно-мочеточникового рефлюкса – в почки [14]. Заметим, что возбудители интраабдоминальных инфекций в большинстве случаев связаны с попаданием микроорганизмов из просвета кишечника в брюшную полость, а исследованный нами биоматериал был получен интраоперационно из брюшной полости. Следовательно, высокий процент устойчивых к антибиотикам возбудителей инфекций может быть связан со значительным уровнем колонизации кишечника такими микроорганизмами. У большинства пациентов, включенных в исследование, присутствовали факторы риска колонизации кишечника изолятами с множественной лекарственной устойчивостью: это пожилой возраст, наличие предыдущих госпитализаций, предшествующая антибактериальная терапия, пребывание в ОРИТ [15, 16]. Следует отметить, что в отделениях терапевтического профиля среди пациентов с инфекциями преобладали люди пожилого и старческого возраста (медиана – 73 года), поэтому можно предполагать наличие у них предыдущих госпитализаций, а также затруднений в обеспечении личной гигиены, что также повышает риск развития эндогенных ИМП. В хирургические отделения большинство пациентов поступали для оперативного лечения преимущественно онкологических заболеваний – так что у них высока вероятность предыдущих госпитализаций, лечения в ОРИТ, антибиотикотерапии и антибиотикопрофилактики, что увеличивает вероятность колонизации кишечника энтеробактериями, устойчивыми к антибиотикам.

Таким образом, при сравнении уровня чувствительности энтеробактерий к β -лактамам в отделениях терапевтического и хирургического профиля статистически зна-

чимых различий не выявлено. Доля продуцентов БЛРС и карбапенемаз была сопоставимой в отделениях разного профиля (35.51% и 39.85%, 8.41% и 9.77% соответственно). За три года мониторинга статистически значимых изменений в доле продуцентов БЛРС и карбапенемаз не зарегистрировано. Отмечены различия в преобладающих типах карбапенемаз у *Enterobacterales* в отделениях терапевтического профиля доминировали сериновые, а в отделениях хирургического профиля – металло- β -лактамазы.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова “Изучение резистентности возбудителей и разработка персонифицированных подходов к выбору и назначению противомикробных препаратов” (0908/006 № 123040300035-3).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого включенного в исследование участника было получено информированное добровольное согласие. Данное ретроспективное исследование было одобрено на заседании локального этического комитета МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол 10/23 от 13.11.2023).

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Эдельштейн М.В., Авраменко А.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. (2021) AMRmap – система мониторинга антибиотикорезистентности в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. **23**(2), 198–204.
2. Ортенберг Э.А., Шпилькина Л.В., Хохлавина Р.М., Кирушок Г.И., Христенко Я.В. (2017) Клиническая значимость и динамика антибиотикорезистентности потенциальных БЛРС-продуцентов в многопрофильном стационаре (локальные данные). *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. **19**(4), 341–344.
3. Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. (2019) AMRcloud: новая парадигма мониторинга антибиотикорезистентности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. **21**(2), 119–124.
4. Duce G., Fabry J., Nicolle L. (2002) *Prevention of Hospital-Acquired Infections: A Practical Guide*, 2nd edition. Geneva: WHO. 64 p.

5. Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С., исследовательская группа РОСНЕТ. (2005) Динамика распространённости и чувствительности БЛРС-продуцирующих энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. **7**(4), 323–336.
6. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эдельштейн М.В., Перепанова Т.С., Козлов Р.С., исследовательская группа “ДАРМИС-2018”. (2019) Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования “ДАРМИС-2018”. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. **21**(2), 134–146.
7. Shevchenko O.V., Mudrak D.Y., Skleenova E.Y., Kozuyeva V.K., Ilina E.N., Ikryannikova L.N., Alexandrova I.A., Sidorenko S.V., Edelstein M.V. (2012) First detection of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**(7), E214–E217.
8. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Шайдуллина Э.Р., Азизов И.С., Шек Е.А., Кузьменков А.Ю., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Семенова Н.В., Слепачкова С.А., Шепотайлова Н.В., Стребкова В.В., Рыбина Н.А., Яранцева Н.З., Перевалова Е.Ю., Розанова С.М., Наговицина С.Г., Молдовану М.Г., Насыбуллова З.З., Архипенко М.В., Шахмурадян Р.М., Нижегородцева И.А., Варибрус Е.В., Александрова И.А., Лазарева А.В., Крыжановская О.А., Маркелова Н.Н., Чернявская Ю.Л., Лебедева Е.В., Кириллова Г.Ш., Беккер Г.Г., Попова Л.Д., Елохина Е.В., Смолькова Ю.Е., Зиновьев Д.Ю., Итяева Л.Н., Блинова Г.Ю., Зубарева Н.А., Витязева В.П., Плаксина М.Г., Куцевалова О.Ю., Панова Н.И., Суборова Т.Н., Полухина О.В., Ворошилова Т.М., Чурикова Е.М., Москвитина Е.Н., Кречикова О.И., Петрова Т.А., Мартянова Н.М., Хохлова К.О., Гудкова Л.В., Быконя С.А., Хохлавина Р.М., Шпилькина Л.В., Бурасова Е.Г., Хребтовская В.А., Молчанова И.В., Звонарева О.В., Корнилова П.А., Крянга В.Г., Портнягина У.С., Шамаева С.Х. (2019) Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования “МАРАФОН 2015–2016”. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. **21**(2), 147–159.
9. Nordmann P., Naas T., Poirel L. (2011) Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* **17**(10), 1791–1798.
10. Ljubović A.D., Granov Đ., Husić E., Gačanović D., Halković J., Lab Ing A.Č., Kotorić Keser Š., Loga Zec S. (2023) Prevalence of extended-spectrum β -lactamase and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples. *Saudi Med. J.* **44**(8), 801–807.
11. Wang Y., Zhang Q., Jin Y., Jin X. Yu J., Wang K. (2019) Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in China. *Braz. J. Microbiol.* **50**(3), 669–675.
12. Митрохин С.Д., Орлова О.Е., Гостева И.В., Шкода А.С. (2020). Потребление антимикробных лекарственных средств в стационаре в зависимости от результатов микробиологического мониторинга ИСМП. *Антибиотики и химиотерапия*. **65**(9–10), 21–27.
13. Шедько Е.Д., Лазарева А.В., Зоркин С.Н., Новикова И.Е., Вершинина М.Г., Тимошина О.Ю., Головешкина Е.Н., Фисенко А.П., Акимкин В.Г. (2021) Динамика частоты встречаемости уропатогенов и антимикробных детерминант резистентности при детской значимой бактериурии в 2017 и 2019 годах: моноцентровое исследование. *Детские инфекции*. **20**(3), 11–17.
14. Яковлев С.В., Суворова М.П. (2016) Нозокомиальные инфекции мочевыводящих путей. *Урология*. **3**(Suppl.), 45–64.
15. Rodríguez-Villodres Á., Martín-Gandul C., Peñalva G., Guisado-Gil A.B., Crespo-Rivas J.C., Pachón-Ibáñez M.E., Lepe J.A., Cisneros J.M. (2021) Prevalence and risk factors for multidrug-resistant organisms colonization in long-term care facilities around the world: a review. *Antibiotics*. **10**(6), 680.
16. Коробова А.Г., Клясова Г.А., Охмат В.А., Кравченко С.К., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. (2017) Колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра при лечении острых миелоидных лейкозов и лимфом. *Гематология и трансфузиология*. **62**(3), 116–123.

Distribution of β -Lactamase-Producing Enterobacterales among Patients in Surgical and Therapeutic Departments of a Multidisciplinary Hospital

S. Yu. Meshchurova^{1, *}, A. G. Korobova^{1, 2}, L. M. Samokhodskaya^{1, 2}

¹*Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192 Russia*

²*Medical Research and Educational Center, Lomonosov*

Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: svetlana.meshchurova@gmail.com*

Prescribing adequate empiric therapy is not possible without local monitoring of the spread of antibiotic-resistant bacteria in each hospital. The aim of the study was to compare the frequency of β -lactamase-producing Enterobacterales in patients of therapeutic and surgical units. Antibiotic susceptibility was evaluated by disk-diffusion method. The production of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) was detected by the double disk method, and carbapenemases were determined by a modified method of carbapenem inactivation. Carbapenemase genes and the expression were quantified by real-time PCR and immunochromatography assay. Among the isolated Enterobacterales, more than one third produced ESBL in both the therapeutic (35.51%) and surgical (39.85%) units. The proportion of carbapenemase producers was comparable in both groups, and amounted to 8.41% and 9.77%, respectively. Metallo- β -lactamases were predominant in surgical units, whereas serine lactamases were predominated in therapeutic ones. Among the out-of-hospital Enterobacterales, β -lactamase producers were isolated less frequently than among the nosocomial ones in both the therapeutic (31.48% and 56.6%) and surgical (45.45% and 51%) wards, but without statistically significant differences. During the three years of the study, we did not detect an increase in the proportion of β -lactamase producers in surgical and therapeutic units, but local monitoring should certainly be continued in order to develop a local strategy for the adequate use of antibacterial drugs.

Keywords: extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase, Enterobacterales, epidemiological monitorings

СрG-СВЕТОФОРЫ УЧАСТВУЮТ В АКТИВНОМ ДЕМЕТИЛИРОВАНИИ ДНК

© 2024 г. А. В. Лиознова^а, Ю. А. Медведева^{а, *}

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: ju.medvedeva@gmail.com

Поступила в редакцию 13.07.2024 г.

После доработки 04.09.2024 г.

Принята к публикации 16.09.2024 г.

Метилирование ДНК – один из важнейших механизмов, вовлеченных в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов. Однако взаимосвязь между метилированием ДНК и экспрессией пока не до конца ясна. Есть примеры, когда изменения в уровне метилирования ДНК вызывают изменения в экспрессии генов, и наоборот – изменения экспрессии влекут за собой изменения в уровне метилирования. Ранее мы ввели понятие СрG-светофоров – отдельных СрG-сайтов, метилирование которых значимо коррелирует с экспрессией, и показали их важную роль в регуляции энхансеров. Теперь мы показали, что уровни метилирования СрG-светофоров гетерогенны в популяции клеток и предположили, что это вызвано их динамическим деметилированием. Наблюдаемое обогащение СрG-светофоров 5-гидроксиметилцитозином (5hmC) и сайтами локализации TET2 (Tet methylcytosine dioxygenase 2) подтвердило нашу гипотезу. С целью выяснить, является ли метилирование СрG-сайтов причиной или следствием экспрессии соответствующего гена, был применен метод статистической оценки направления причинной связи. В результате проведенного анализа среди СрG-сайтов идентифицированы такие, метилирование которых является причиной изменения экспрессии, и такие, для которых изменения в экспрессии вызывают изменения в метилировании. Для СрG-сайтов первого типа характерны более стабильные уровни метилирования в разных клетках и менее выраженное деметилирование в сравнении с СрG-сайтами второго типа. Также показано, что в промоторных областях доля СрG-сайтов, метилирование которых влияет на экспрессию, больше, чем в теле гена, для которого метилирование, скорее всего, следствие экспрессии. На основании этих наблюдений можно предположить, что уровни метилирования СрG-сайтов стабильны там, где они определяют экспрессию ассоциированного с этими сайтами гена, работая по принципу “выключателя”. И, наоборот, для СрG-сайтов, зависящих от экспрессии, уровень метилирования динамичен и различается между клетками в популяции, что вызвано, в первую очередь, активным деметилированием.

Ключевые слова: метилирование ДНК, СрG-сайты, экспрессия генов, эпигенетическая регуляция, причинно-следственные связи

DOI: 10.31857/S0026898424060122, **EDN:** IANHQG

ВВЕДЕНИЕ

Метилирование ДНК представляет собой ковалентную модификацию ДНК без изменения ее нуклеотидной последовательности и служит одним из важнейших механизмов эпигенетической регуляции генома. У млекопитающих чаще всего метилированы цитозины в контексте СрG-динуклеотидов, причем плотность покрытия со-

ставляет 70–80% от общего числа сайтов [1–3]. Неметилированные СрG-динуклеотиды часто обнаруживают в СрG-островках, которые присутствуют в 5'-регуляторных областях многих генов [4], а также других транскрибируемых регионах – даже вдали от генов [5]. Ранее Panchin и др. [6] предположили, что метилированные СрG-сайты остаются функциональными. И это очень услож-

Сокращения: 5hmC – 5-гидроксиметилцитозин; FDR (false discovery rate) – поправка на множественное тестирование; NPC (neural progenitor cells) – нейрональные прогениторные клетки; TSS (transcription start site) – сайт начала транскрипции; TTS (transcription termination site) – сайт терминации транскрипции; М→Э – “Метилирование→Экспрессия” (изменения уровня метилирования вызывают изменения экспрессии); ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; Э→М – “Экспрессия→Метилирование” (изменения в экспрессии вызывают изменения уровня метилирования).

няет изучение причинно-следственных связей в механизмах регуляции.

Метилирование/деметилирование ДНК в регуляции транскрипции. Влияние метилирования ДНК на структуру хроматина имеет большое значение для развития и функционирования живого организма. Однако, взаимосвязь между метилированием ДНК и экспрессией генов неоднозначна. Ранее нами была предложена [7] и доработана [8] концепция СрG-светофоров – СрG-динуклеотидов, метилирование которых достоверно коррелирует с экспрессией расположенного рядом гена.

Чаще всего метилирование регуляторных элементов в промоторе (и энхансере [9, 10]) ведет к подавлению экспрессии генов [11–16]. Правда, описаны гены, транскрипция которых не зависит от метилирования [17], а также промоторы, метилирование только отдельных участков которых влияет на экспрессию [18, 19]. Заметим, что метилирование тела гена часто ассоциировано с активной транскрипцией. В этом случае метилирование ДНК служит не причиной, а следствием активной транскрипции. Вот один из примеров: комплекс элонгации привлекает комплекс триметилирования гистона H3K36 (содержащий белок SETD2), а тот, в свою очередь, связывается с ДНК-метилтрансферазой DNMT3A, которая вводит метильные группы в тело гена [20].

Хотя принято считать, что метилирование соседних СрG-позиций согласовано, экспериментально выявлены случаи, когда метилирование именно отдельных СрG-позиций связано с экспрессией конкретных генов. Вот несколько примеров подобных наблюдений, опубликованных за последние годы.

→ Деметилирование отдельного СрG-динуклеотида внутри экзона-5 гена *PGLYRP3* связано с увеличением экспрессии гена. Неметилированная позиция в основном привлекает РНК-связывающие белки, в том числе факторы сплайсинга. Это значит, что деметилирование этой позиции способствует транскрипции *PGLYRP3* и/или сплайсингу пре-мРНК [21].

→ Метилирование отдельных СрG-динуклеотидов в позициях –77 и +24 регулирует экспрессию гена *TLR2* в периферических мононуклеарных клетках крови [22].

→ Метилирование одной СрG-позиции (СрG9) регулирует экспрессию гена *CHIP* при раке молочной железы [23].

→ СрG-позиция +286, находящаяся во втором экзоне гена *И6* мышей, играет важную роль в регуляции экспрессии *И6*. Гипометилирование СрG+286 повышает экспрессию *И6* [24].

Активное деметилирование ДНК [25–27] – процесс, обратный метилированию, – открыт относительно недавно, видимо, по причине многостадийности [28]. Первый этап активного деметилирования – под действием белков группы ТЕТ из 5-метилцитозина (5mC) образуется 5-гидроксиметилцитозин (5hmC). Белки этой группы используют молекулярный кислород для включения гидроксильной группы в 5mC [29]. Конвертировать 5mC в 5hmC способен не только белок ТЕТ1, но и белки ТЕТ2 и ТЕТ3 [30]. Те же ТЕТ-ферменты окисляют 5hmC дальше: до 5-формилцитозина (5fC) и затем 5-карбоксилцитозина (5caC). 5fC и 5caC могут быть удалены из ДНК и заменены на неметилированный цитозин при репарации оснований [31]. Таким образом, наличие 5hmC может служить индикатором именно происходящего активного деметилирования в клетке, поскольку обратный процесс – метилирование ДНК – происходит в одну стадию, без формирования промежуточных продуктов. Однако это не дает ответа на вопрос: что первично в цепочке этих причинно-следственных связей: метилирование/деметилирование СрG-позиций или изменение уровня экспрессии гена? Ответ на этот вопрос важен и с теоретической, и с практической точек зрения – именно воздействуя на причину, можно изменять структуру хроматина и тем самым экспрессию генов, в том числе в терапевтических целях.

Математические подходы к поиску причинно-следственных связей. Ответы на вопросы причинности (а не вопросы ассоциаций) требуют значительного расширения языка математической статистики, который разрабатывается в области под названием *causal inference* [32, 33]. Стандартный статистический анализ направлен на то, чтобы по отдельным измерениям оценить параметры распределения, которому эти измерения подчиняются. Основываясь на параметрах этих распределений, можно делать выводы об ассоциативной связи между переменными, что позволяет оценивать вероятности событий. Причинно-следственный анализ ищет ответ на вопрос, какое явление вызывает другое явление.

В настоящее время исследователи проводят поиск причинно-следственных связей между метилированием ДНК и экспрессией генов. Введем нотацию М→Э (Метилирование→Экспрессия), чтобы обозначить случаи, когда изменения в уровне метилирования являются причиной изменений в экспрессии; и Э→М (Экспрессия→Метилирование) для случаев, когда изменения в экспрессии вызывают изменения уровня метилирования. Результаты исследований пока остаются противоречивыми. Например:

→ D. Taylor с соавт. [34] выявили 213 причинно-следственных связей между экспресси-

ей (115 генов) и метилированием ДНК (190 сайтов метилирования), из которых 64% имели направление М→Э и 36% Э→М. Сайты метилирования ДНК для пар М→Э находились ближе к сайтам начала транскрипции (transcription start site, TSS), чем для пар Э→М;

→G. Hemani с соавт. [35] сообщали, что в среднем случаи М→Э встречались чаще, чем Э→М, но при этом заметили, что результат подвержен сильным искажениям, связанным с погрешностью измерений.

→P. Нор с соавт. [36] идентифицировали 818 генов, которые влияли на паттерны метилирования ДНК в крови, то есть для них, реализуется направление Э→М. Среди найденных генов значимо чаще встречались транскрипционные факторы;

→X. Мо с соавт. [37] выявили 5 причинно-следственных цепочек “М→Э→ревматоидный артрит” для CpG-сайтов, локализованных в CpG-островках промоторов генов;

→J. Zhang с соавт. [38] исследовали влияние переменных на выживаемость при раке шейки матки и выявили 12623 гена, для которых реализуется направление М→Э. Интересно, что большинство этих генов содержит меньше 50 CpG-сайтов.

→K. van Eijk с соавт. [39] привели доказательства в поддержку направления М→Э, а не наоборот. Авторы выбрали 20 CpG-сайтов, ассоциированных с экспрессией 19 генов, содержащих суммарно 147 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП). Для модели ОНП→М→Э авторы нашли 29.9% комбинаций в ее поддержку, а для модели ОНП→Э→М — 6.8%. Для локуса одного из генов выявлены причинно-следственные связи в обоих направлениях.

→A. Díez-Villanueva A. с соавт. [40] рассматривали связи между ОНП, метилированием и экспрессией. Авторы показали, что 60.1% этих комбинаций подчинялось каноническому пути М→Э, 33.9% не имело причинно-следственной связи между метилированием и экспрессией генов, а 6% реализовали путь Э→М;

→V. Pierce с соавт. [41], выявили более 400 пар метилирования—экспрессии (проанализировано 2913 пар) с наличием причинно-следственной связи. Из них 161 пара подчинялась модели ОНП→М→Э, а 125 пар — ОНП→Э→М; эти множества включали 119 общих пар, которые “работали” в двух направлениях. Авторы заметили, что проще выявить наличие причинно-следственной связи, чем ее направление.

В целом уже сейчас очевидно, что взаимосвязь между метилированием ДНК и экспрессией генов имеет неоднозначный характер. Ранее

нами описан механизм работы CpG-светофоров [7, 8], теперь мы детально исследовали динамику их метилирования—деметилования в процессе регуляции транскрипции и проанализировали причинно-следственные связи между процессами метилирования и экспрессии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор CpG-светофоров и контрольных позиций. В работе использовано понятие “CpG-светофор”, подробно описанное нами ранее [8] и обозначающее CpG-позиции, метилирование которых связано с экспрессией ассоциированного гена. Для 48 образцов тканей и клеток человека из проекта ENCODE (<https://www.encodeproject.org/>) проанализированы все пары “ген и CpG-динуклеотид”, где динуклеотид расположен в промежутке от –10000 п.н. в 5'-направлении от TSS и до 3'-конца гена (transcription termination site, TTS), то есть все CpG-позиции на участке [–10000 п.н., TTS]. При таком выборе позиций один CpG-динуклеотид может быть ассоциирован с несколькими генами, а один ген — с несколькими динуклеотидами. Для каждой пары “ген и CpG-динуклеотид” были построены два вектора: метилирования этой позиции во всех доступных образцах и экспрессии ассоциированного гена во всех доступных образцах, — после чего вычисляли коэффициент корреляции Спирмена между этими двумя векторами и вводили поправку на множественное тестирование (false discovery rate, FDR) методом Бенджамини-Хохберга. CpG-позиция называется CpG-светофором, если для нее коэффициент корреляции Спирмена между метилированием и экспрессией значим на уровне $FDR < 0.01$. В пару к каждому CpG-светофору была выбрана фоновая CpG-позиция с учетом расстояния до TSS, GC-и CpG-контента (подробный алгоритм см. в разделе “Методы” работы [8]). Процесс выбора фоновых позиций был независимо повторен 50 раз.

Анализ уровня 5-гидроксиметилцитозина. В стандартных экспериментах, использующих бисульфитную конверсию (BS), нельзя отличить 5hmC от его предшественника 5mC, так как в этих условиях обе модификации ведут себя одинаково [42] и исследователь измеряет суммарный уровень (5mC + 5hmC). С целью дифференцировать сигналы 5mC и 5hmC дополнительно проводили бисульфитную конверсию с окислением (oxBS), которая позволяет измерить уровень только 5mC (не включая 5hmC). Уровень 5hmC вычисляли как разницу (BS – oxBS).

Для анализа использовали данные Illumina 450K oxBS-array, полученные S. Field с соавт. [43] (идентификатор данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE63179>).

(Авторы провели бисульфитную конверсию, а также бисульфитную конверсию с окислением для 450 тыс. проб в клетках мозжечка человека. Авторы предложили метод анализа, при котором сигнал сглаживается, но мы приняли решение не вносить дополнительные вычислительные шумы, а воспользоваться исходными данными.) Для каждой пробы мы вычисляли разницу ($BS - oxBS$) и усредняли полученные величины по 4 репликам, то есть использовали значение $5hmC$, равное $avg(BS_1 - oxBS_1, BS_2 - oxBS_2, BS_3 - oxBS_3, BS_4 - oxBS_4)$. При таком подходе возможны отрицательные значения $5hmC$, возникающие вследствие неточности измерений по обоим протоколам. Интерпретировать их не представляется возможным, но это не препятствовало пониманию общей картины, так как нас интересовали различия между уровнями $5hmC$, а не абсолютные значения.

Анализ связывания TET2. Для анализа связывания белка TET2 мы воспользовались данными

ми, полученными Y. Qiao и др. [44]. Нами были выбраны полногеномные профили, полученные анализом ChIP-Seq, локализации TET2 в дифференцированных на 12 суток клетках нейронов NPC (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM1668531>). Авторы определили регионы локализации белка TET2 (пики ChIP-seq) на сборке генома hg19. Нами была использована утилита liftOver [45] для того, чтобы перенести координаты регионов локализации TET2 на hg38.

Учитывая, что СрG-светофоры были выбраны на основе анализа 48 различных тканей, мы предположили, что лежащие в основе механизмы являются фундаментальными и не зависят от конкретной ткани. Тем не менее, мы выбрали дифференцирующиеся нейроны как максимально близкие (из доступных опубликованных образцов) к описанным выше данным $5hmC$ в мозжечке человека, чтобы сравнение было более адекватным.

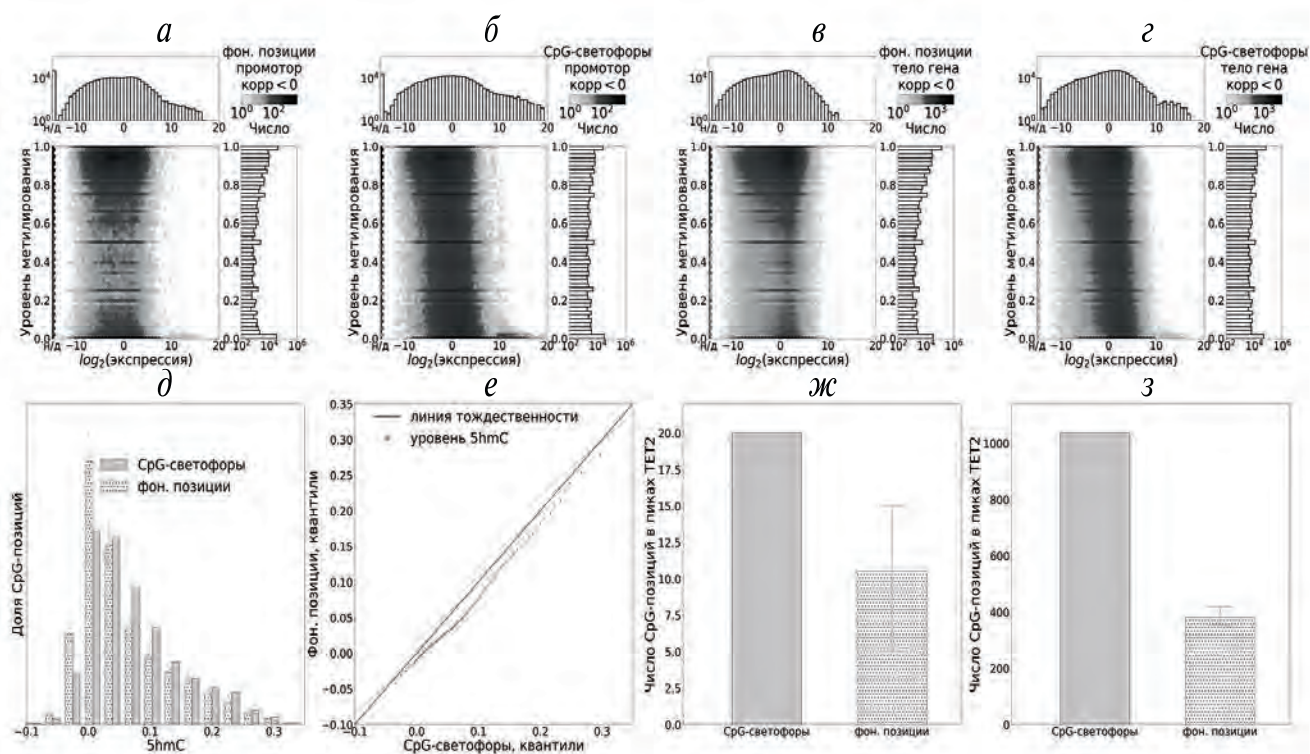


Рис. 1. Распределение метилирования и экспрессии генов, ассоциированных с СрG-светофорами и фоновыми позициями с отрицательным коэффициентом корреляции Спирмена. Тон отражает плотность точек в логарифмическом масштабе. Распределение показано для случайных фоновых СрG-позиций в промоторе (число позиций равно числу СрG-светофоров) (а); СрG-светофоров в промоторе (б); случайных фоновых СрG-позиций в теле гена (в); СрG-светофоров в теле гена [+500, TTS] (г). На панели (д) показано распределение доли СрG-светофоров и фоновых СрG-позиций в зависимости от уровня $5hmC$ в образце мозжечка; на панели (е) — квантили распределения (д). На панелях (ж) и (з) показано число СрG-позиций, локализованных с пиками сигнала TET2 в двух различных образцах соответственно: дифференцированных на 12 суток нейронах (клетки NPC) и макрофагов, полученных из моноцитов. Здесь и далее на рисунках: планки погрешностей соответствуют 5%- и 95%-ному процентилю из 50 выборок фоновых позиций; для фоновых позиций приведена медиана из 50 выборок; фон. позиции — фоновые позиции; корр — коэффициент корреляции Спирмена.

Число пиков, колокализованных с CpG-позициями в клетках NPC, невелико, поэтому для подтверждения полученных результатов мы использовали второй образец полногеномных профилей локализации TET2, полученных I. Soboc с соавт. [46]. Нами выбраны данные, полученные для макрофагов, дифференцированных из моноцитов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE206030>). Авторами опубликованы пики TET2 на сборке hg38.

Для анализа колокализации TET2 и выбранных CpG-сайтов интервалы были пересечены с помощью утилиты bedtools intersect [47].

Поиск причинно-следственных связей. Для изучения направления причинно-следственных связей в геномных данных на настоящий момент разработано несколько инструментов [48]. Для анализа направления связи мы следовали логике, описанной в книге J. Peters и др. [32], а именно логике иллюстративного примера 4.5 (рис. S1, Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Lioznova_rus.zip). В этом примере рассмотрена выборка (X, Y), для которой построена линейная регрессия в обоих направлениях: $X \rightarrow Y$ и $Y \rightarrow X$, — после чего проанализированы остатки (ошибки) полученной регрессионной модели. Если регрессионная модель отражает истинное направление причинно-следственной связи, то распределение остатков будет независимым.

В данной работе выбран инструмент dHSIC [49], реализующий описанную логику. Мы предполагаем линейную связь между исследуемыми переменными $\text{model} \sim \text{lm}(X \sim Y)$, после чего анализируем распределение остатков $\text{dhsic.test}(\text{model}\$residuals, Y)\$p.value$. Такая проверка проводится для обоих потенциальных направлений причинно-следственной связи, в нашем случае для $\text{Э} \rightarrow \text{М}$ и $\text{М} \rightarrow \text{Э}$. Таким образом, в результате анализа для каждой пары “ген и CpG-динуклеотид” мы получили две величины p -value, отражающие значимость для обоих потенциальных направлений связи. С целью скорректировать p -value на полное число пар “ген и CpG-динуклеотид” мы произвели поправку FDR на множественное тестирование методом Бенджамини-Хохберга. Значимым считали p -value < 0.05 после поправки методом Бенджамини-Хохберга. Определенное направление связи между экспрессией и метилированием ДНК приписывали паре “ген и CpG-динуклеотид”, если одно из двух значений p -value было меньше заданного порога.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гетерогенность уровня метилирования CpG-светофоров

Конкретный CpG-динуклеотид может быть либо метилирован, либо нет, то есть в отдельной клетке на уровне определенного аллеля уровень метилирования бинарен (0 или 1 в используемой нами нотации). В диплоидной клетке аллельспецифичное метилирование CpG-позиций может привести к уровню метилирования 0.5. Аллельспецифичное метилирование найдено для 10% генов человека [50] и обычно ассоциировано с генетическими полиморфизмами [50, 51] или импринтингом. Статус метилирования конкретных позиций ДНК, в отличие от генотипа, может различаться между разными клетками одного организма (даже внутри одного типа клеток). В связи с этим на практике измеряют долю метилированных CpG-позиций, а не бинарное значение метилирования в позиции [51, 52], то есть наблюдается гетерогенность уровней метилирования в данной CpG-позиции среди отдельных клеток.

Для большинства CpG-позиций, которые не относятся к CpG-светофорам (фоновые CpG-позиции), уровни метилирования близки либо к 0, либо к 1 во всех изученных типах клеток (рис. 1а, в). Это свидетельствует об однородности уровней метилирования в клеточной популяции, причем в теле гена метилирование чаще всего близко к 1. В то же время CpG-светофоры с отрицательным коэффициентом корреляции Спирмена между экспрессией и метилированием, расположенные как в промоторах, так и в теле гена, часто имеют промежуточные уровни метилирования во многих типах клеток (рис. 1б, г). Аналогичная тенденция зарегистрирована и для CpG-светофоров с положительным коэффициентом корреляции Спирмена (рис. S2, см. электронное приложение).

CpG-светофоры деметилируются динамически

В связи с тем, что уровни метилирования CpG-светофоров более гетерогенны, чем фоновых CpG-позиций, было решено проверить, является ли это наблюдение следствием более динамичного процесса деметилирования этих позиций. В качестве параметров, отражающих изменения метилирования, мы использовали уровень 5hmC и сигнал связывания белка TET2 — параметры, отражающие деметилирование этих позиций. Хотя функциональная роль 5hmC не совсем ясна, одна из наиболее популярных гипотез заключается в том, что это промежуточный продукт активного деметилирования ДНК с участием белков группы TET [53].

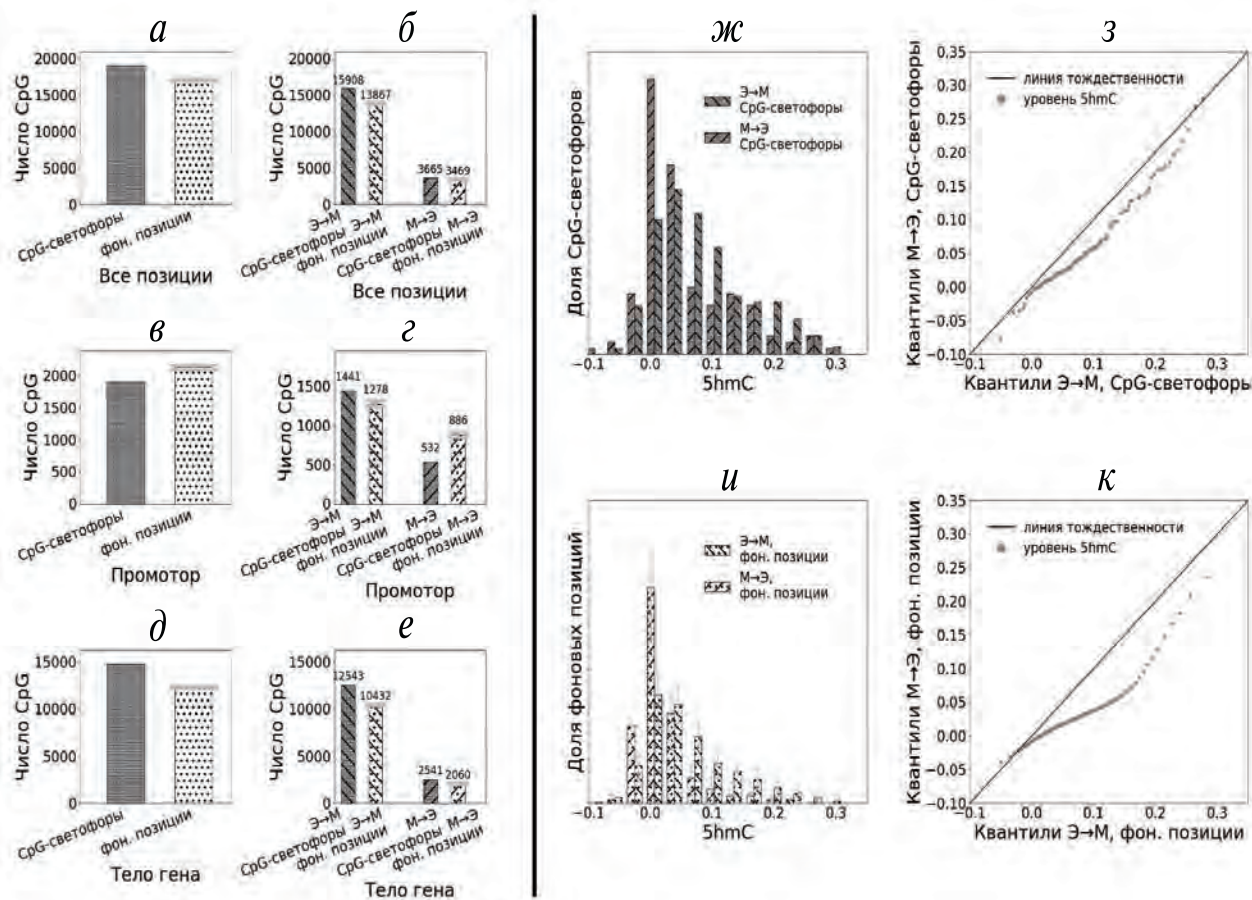


Рис. 2. Анализ причинно-следственных связей и распределения 5hmC в зависимости от направления связи. На левой панели представлены результаты количественного анализа СрG-позиций, для которых выявлено наличие причинно-следственной связи. Левая колонка показывает общее число позиций, а колонка справа — число позиций в зависимости от направления связи. На графиках показано число позиций, имеющих коэффициент причинно-следственной связи для СрG-светофоров и фоновых СрG-позиций во всем геноме (а) и их уточнение — число позиций в зависимости от направления связи (б). На видах (в) и (з) показаны позиции в промоторной области [−1000, TSS+500], на (д) и (е) — в теле гена [TSS+500, TTS]. На правой панели представлено распределение доли 5hmC: (ж) — распределение доли СрG-светофоров в зависимости от уровня 5hmC для обоих направлений причинно-следственной связи; (з) — квантили распределения на виде (ж); (и) — распределение, аналогичное (ж), только для фоновых СрG-позиций; (к) — квантили распределения на панели (и).

Как видно из данных, приведенных на рис. 1(д,е), по сравнению с фоновыми СрG-позициями большая доля СрG-светофоров обогащена 5hmC. Заметим, что здесь мы привели долю, а не общее число СрG-позиций, так как данные получены для 450 тыс. СрG-проб, выбранных по геному неслучайно, что может исказить абсолютные значения количества числа СрG-светофоров и фоновых позиций. Кроме обогащения 5hmC, СрG-светофоры гораздо чаще колокализовались с TET2, чем фоновые СрG-позиции (рис. 1ж,з). Это согласуется с результатами, полученными нами ранее [54].

Таким образом, полученные здесь данные служат подтверждением выдвинутой нами гипотезы о динамическом деметилировании СрG-светофоров. Модель динамического деметилирования

СрG-светофоров может объяснить наблюдаемую среди них неоднородность уровней метилирования в клеточной популяции.

Активное деметилирование происходит в позициях Э→М

На следующем этапе исследования СрG-позиции были разделены на подгруппы на основе оценки причинно-следственной связи между уровнями экспрессии и метилирования: изменения в метилировании ДНК вызывают изменения экспрессии (М→Э) или уровни метилирования зависят от интенсивности экспрессии (Э→М).

Прежде всего мы убедились, что для СрG-светофоров значимо чаще бывает определено направ-

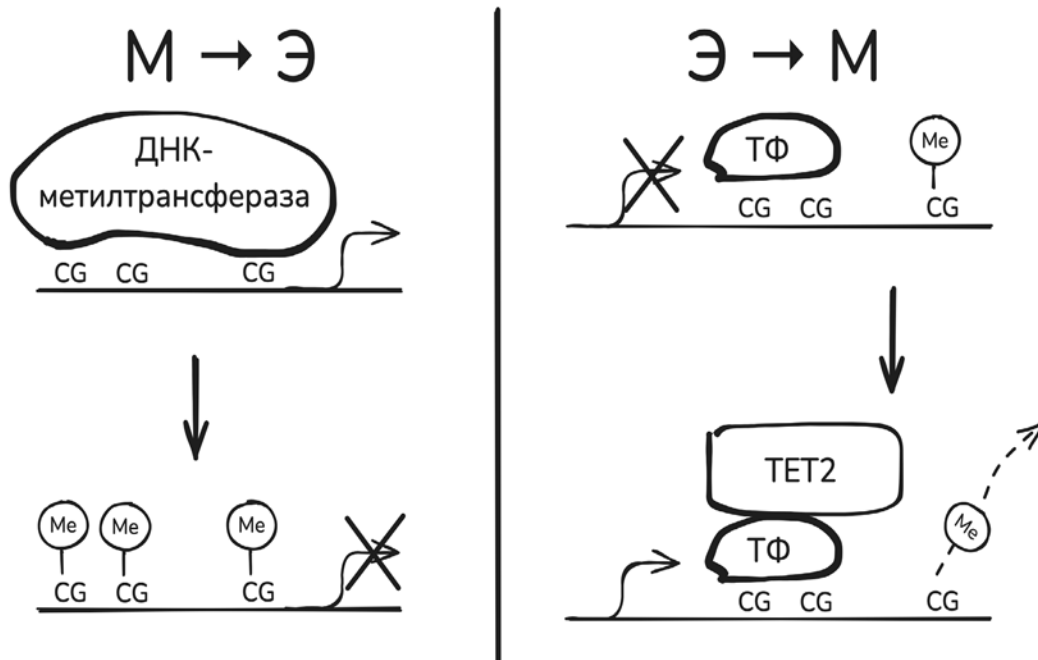


Рис. 3. Предполагаемый механизм функционирования CpG-светофоров. На левой панели представлены CpG-светофоры, в которых изменения уровня метилирования (Me) вызывают изменения экспрессии ассоциированного гена. Такие CpG-светофоры чаще встречаются в промоторах, их метилирование стабильно и работают они по принципу “вкл/выкл”. Правая панель показывает CpG-светофоры, для которых уровень метилирования зависит от экспрессии гена. Их метилирование различно между клетками и динамично, что вызвано активным деметилированием. Деметилирование происходит под действием метилцитозиндиоксигеназы TET2, которая привлекается транскрипционными факторами (ТФ).

ление причинно-следственной связи, чем для фоновых CpG-позиций (рис. 2а). При рассмотрении только промоторных областей видно, что здесь число CpG-светофоров, для которых определено направление причинно-следственной связи, меньше числа фоновых CpG-позиций (рис. 2б).

Далее мы проанализировали соотношение числа позиций, поддерживающих каждое из направлений связи. Мы заметили, что связь Э→М (уровень экспрессии определяет уровень метилирования) встречается примерно в 4 раза чаще, чем М→Э (уровень метилирования определяет уровень экспрессии) для всех позиций (рис. 2б), но в промоторной области разница меньше (рис. 2г). Эта тенденция согласуется с признанным тезисом, что метилирование промотора гена подавляет его экспрессию.

С целью лучше понять процесс деметилирования ДНК мы проанализировали уровень 5hmC в свете причинно-следственных связей между уровнями метилирования ДНК и экспрессии. Заметим, что именно CpG-позиции с направлением причинно-следственной связи Э→М обогащены 5hmC (рис. 2ж,и). Это может означать наличие положительной обратной связи между активной транскрипцией и деметилированием ДНК. Для наглядности мы привели квантиль-квантильные распределения (рис. 2з,к), которые показывают

разницу распределений при разных направлениях причинно-следственной связи. Отметим, что разница между фоновыми CpG-позициями и CpG-светофорами с направлением связи М→Э (рис. S3а,б, см. электронное приложение) более выражена, чем для всех позиций в целом (рис. 1д,е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании результатов многочисленных исследований, посвященных механизмам метилирования ДНК, ни у кого не вызывает сомнения, что это самый сложный процесс, регулируемый в том числе на уровне отдельных CpG-динуклеотидов. Известно, что часто соседние CpG-динуклеотиды метилируются подобным образом. В частности показано, что метилирование новосинтезированной ДНК-цепи под действием ДНК-метилтрансферазы 1 (DNMT1) происходит с учетом уровня метилирования не только той же позиции материнской цепи, но и соседних динуклеотидов [55]. Кроме того, метилирование тела активно транскрибируемого гена под действием ДНК-метилтрансферазы 3А (DNMT3А) обусловлено, как предполагают, привлечением этой метилтрансферазы белком SETD2, который регулируется комплексом элонгации [56]. Также показано,

что гетеротетрамер DNMT3A/3L содержит два активных центра и одновременно метилирует СрG-сайты на расстоянии 12 нуклеотидов [57]. При исследовании структуры фермента DNMT3A показано, что он может скоординированно метилировать СрG-сайты на расстоянии от 8 до 10 нуклеотидов [58–60].

Напротив, активное деметилирование, видимо, представляет более локальный процесс. Показано, что связывание белков группы ТЕТ с ДНК происходит специфически и определяется ее последовательностью (сиквенспецифично) [61]. В работах Suzuki с соавт. [62, 63] показано, что белок ТЕТ2, который не имеет ДНК-связывающего домена, привлекается рядом транскрипционных факторов, которые сиквенспецифично связывают ДНК. Следовательно, этот механизм реализуется скорее локально, и это подтверждено нами ранее [54].

Можно предположить, что метилирование цитозинов в районе СрG-светофоров может накапливаться вследствие отсутствия связывания транскрипционных факторов, что приводит к метилированию СрG-светофоров, т.е. их метилирование в этом случае не причина, а следствие “пассивная” метка отсутствующей экспрессии гена в результате инактивации его регуляторного элемента. Эта гипотеза подтверждается результатами нескольких исследований [64, 65], в том числе, полученными нами теперь.

Деметилирование регуляторного района также может быть следствием связывания определенных факторов транскрипции, которые привлекают ТЕТ-белки. В этом случае выглядит логичным, что деметилирование происходит не в самом сайте связывания, а в его ближайших окрестностях, с которыми деметилаза может входить в прямой контакт.

Мы предполагаем, что СрG-позиции, в которых уровень метилирования определяет уровень экспрессии, — это районы, где метилирование ДНК работает как своего рода переключатель, который устанавливается одновременно и далее поддерживается в таком состоянии при делении клеток. Таким образом, уровень метилирования оказывается близким к 0 или 1 во всех клетках этого типа, а районы, где уровень экспрессии определяет уровень метилирования, гетерогенны и, видимо, возникают в значительной степени как результат активного деметилирования с использованием ТЕТ-белков, связывание которых происходит динамически в разных клетках (рис. 3).

Таким образом, на основании экспериментально полученных результатов можно сделать вывод, что метилирование промоторов генов

не всегда вызывает подавление экспрессии [66]. Следовательно, для решения медицинских и других прикладных задач воздействие на уровень метилирования не всегда правомерно. Метилирование СрG-позиций может быть не причиной, а лишь следствием изменения экспрессии. Разработанная нами модель позволит в будущем более точно выбирать СрG-мишени для воздействия на экспрессию ассоциированных с ними генов.

Работа частично поддержана грантом РНФ-23-14-00371.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ziller M.J., Gu H., Müller F., Donaghey J., Tsai L.T.Y., Kohlbacher O., De Jager P.L., Rosen E.D., Bennett D.A., Bernstein B.E., Gnirke A., Meissner A. (2013) Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*. **500**, 477–481.
2. Schroeder D.I., Blair J.D., Lott P., Yu H.O.K., Hong D., Crary F., Ashwood P., Walker C., Korf I., Robinson W.P., LaSalle J.M. (2013) The human placenta methylome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 6037–6042.
3. Loyfer N., Magenheim J., Peretz A., Cann G., Bredno J., Klochendler A., Fox-Fisher I., Shabi-Porat S., Hecht M., Pelet T., Moss J., Drawshy Z., Amini H., Moradi P., Nagaraju S., Bauman D., Shveiky D., Porat S., Dior U., Rivkin G., Or O., Hirshoren N., Carmon E., Pikarsky A., Khalaileh A., Zamir G., Grinbaum R., Abu Gazala M., Mizrahi I., Shussman N., Korach A., Wald O., Izhar U., Erez E., Yutkin V., Samet Y., Rotnemer Golinkin D., Spalding K.L., Druid H., Arner P., Shapiro A.M.J., Grompe M., Aravanis A., Venn O., Jamshidi A., Shemer R., Dor Y., Glaser B., Kaplan T. (2023) A DNA methylation atlas of normal human cell types. *Nature*. **613**, 355–364.
4. Hernando-Herraez I., Garcia-Perez R., Sharp A.J., Marques-Bonet T. (2015) DNA methylation: insights into human evolution. *PLoS Genet*. **11**, e1005661.
5. Medvedeva Y.A., Fridman M.V., Oparina N.J., Malko D.B., Ermakova E.O., Kulakovskiy I.V., Heinzl A., Makeev V.J. (2010) Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome. *BMC Genomics*. **11**, 1–16.
6. Panchin A.Y., Makeev V.J., Medvedeva Y.A. (2016) Preservation of methylated CpG dinucleotides in human CpG islands. *Biol. Direct*. **11**, 1–15.
7. Pardo L.M., Rizzu P., Francescatto M., Vitezic M., Leday G.G.R., Sanchez J.S., Khamis A., Takahashi H., van de Berg W.D.J., Medvedeva Y.A., van de Wiel M.A., Daub C.O., Carninci P., Heutink P. (2013) Regional

- differences in gene expression and promoter usage in aged human brains. *Neurobiol. Aging*. **34**, 1825–1836.
8. Lioznova A.V., Khamis A.M., Artemov A.V., Besedina E., Ramensky V., Bajic V.B., Kulakovskiy I.V., Medvedeva Y.A. (2019) CpG traffic lights are markers of regulatory regions in human genome. *BMC Genomics*. **20**, 102.
 9. Pan X., Li X., Sun J., Xiong Z., Hu H., Ning S., Zhi H. (2022) Enhancer methylation dynamics drive core transcriptional regulatory circuitry in pan-cancer. *Oncogene*. **41**, 3474–3484.
 10. Benetatos L., Vartholomatos G. (2018) Enhancer DNA methylation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1999–2009.
 11. Stein R., Razin A., Cedar H. (1982) In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**, 3418–3422.
 12. Anastasiadi D., Esteve-Codina A., Piferrer F. (2018) Consistent inverse correlation between DNA methylation of the first intron and gene expression across tissues and species. *Epigenetics Chromatin*. **11**, 1–17.
 13. Kang J.G., Park J.S., Ko J.H., Kim Y.S. (2019) Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system. *Sci. Rep.* **9**, 1–12.
 14. Antequera F., Bird A. (1993) CpG islands. *EXS*. **64**, 169–185.
 15. Deaton A.M., Bird A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010–1022.
 16. Meehan R., Lewis J., Cross S., Nan X., Jeppesen P., Bird A. (1992) Transcriptional repression by methylation of CpG. *J. Cell Sci. Suppl.* **16**, 9–14.
 17. Bird A.P. (1984) DNA methylation versus gene expression. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **83**(Suppl), 31–40.
 18. Eckhardt F., Lewin J., Cortese R., Rakyan V.K., Attwood J., Burger M., Burton J., Cox T.V., Davies R., Down T.A., Haefliger C., Horton R., Howe K., Jackson D.K., Kunde J., Koenig C., Liddle J., Niblett D., Otto T., Pettett R., Seemann S., Thompson C., West T., Rogers J., Olek A., Berlin K., Beck S. (2006) DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat. Genet.* **38**, 1378–1385.
 19. Weber M., Hellmann I., Stadler M.B., Ramos L., Pääbo S., Rebhan M., Schübeler D. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 457–466.
 20. Jones P.A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–492.
 21. Sobiak B., Leśniak W. (2019) The effect of single CpG demethylation on the pattern of DNA-protein binding. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(4), 914.
 22. Bordagaray M.J., Fernández A., Astorga J., Garrido M., Hernández P., Chaparro A., Lira M.J., Gebicke-Haerter P., Hernández M. (2022) CpG single-site methylation regulates TLR2 expression in proinflammatory PBMCs from apical periodontitis individuals. *Front. Immunol.* **13**, 861665.
 23. Gohno T., Hanamura T., Kurosumi M., Takei H., Yamaguchi Y., Hayashi S.I. (2022) One DNA methylation regulates gene expression of human breast cancer and predicts recurrence. *Anticancer Res.* **42**, 759–766.
 24. Lian B.S.X., Kawasaki T., Kano N., Ori D., Ikegawa M., Isotani A., Kawai T. (2022) Regulation of expression by single CpG methylation in downstream of transcription initiation site. *iScience*. **25**, 104118.
 25. Wu X., Zhang Y. (2017) TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 517–534.
 26. Wu S.C., Zhang Y. (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 607–620.
 27. Prasad R., Yen T.J., Bellacosa A. (2021) Active DNA demethylation — the epigenetic gatekeeper of development, immunity, and cancer. *Adv. Genet.* **2**, e10033.
 28. Moore L.D., Le T., Fan G. (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. **38**, 23–38.
 29. Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L.M., Liu D.R., Aravind L., Rao A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. **324**, 930–935.
 30. Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V., Hong K., Sowers L.C., Zhang Y. (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. **466**, 1129–1133.
 31. Shi D.Q., Ali I., Tang J., Yang W.C. (2017) New insights into 5hmC DNA modification: generation, distribution and function. *Front. Genet.* **8**, 100.
 32. Peters J., Janzing D., Scholkopf B. (2017) *Elements of Causal Inference: Foundations and Learning Algorithms*. MIT Press.
 33. Pearl J. (2010) An introduction to causal inference. *Int. J. Biostat.* **6**, Article 7. doi: 10.2202/1557–4679.1203
 34. Taylor D.L., Jackson A.U., Narisu N., Hemani G., Erdos M.R., Chines P.S., Swift A., Idol J., Didion J.P., Welch R.P., Kinnunen L., Saramies J., Lakka T.A., Laakso M., Tuomilehto J., Parker S.C.J., Koistinen H.A., Davey Smith G., Boehnke M., Scott L.J., Birney E., Collins F.S. (2019) Integrative analysis of gene expression, DNA methylation, physiological traits, and genetic variation in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 10883–10888.
 35. Hemani G., Tilling K., Davey Smith G. (2017) Orienting the causal relationship between imprecisely measured traits using GWAS summary data. *PLoS Genet.* **13**, e1007081.
 36. Hop P.J., Luijk R., Daxinger L., van Ijzerman M., Dekkers K.F., Jansen R., BIOS Consortium, van Meurs J.B.J., 't Hoen P.A.C., Ikram M.A., van Greevenbroek M.M.J., Boomsma D.I., Slagboom P.E., Veldink J.H., van Zwet E.W., Heijmans B.T. (2020) Genome-wide identification of genes regulating DNA

- methylation using genetic anchors for causal inference. *Genome Biol.* **21**, 220.
37. Mo X.B., Zhang Y.H., Lei S.F. (2021) Integrative analysis identifies potential causal methylation-mRNA regulation chains for rheumatoid arthritis. *Mol. Immunol.* **131**, 89–96.
 38. Zhang J., Lu H., Zhang S., Wang T., Zhao H., Guan F., Zeng P. (2021) Leveraging methylation alterations to discover potential causal genes associated with the survival risk of cervical cancer in TCGA through a two-stage inference approach. *Front. Genet.* **12**, 667877.
 39. van Eijk K.R., de Jong S., Boks M.P.M., Langeveld T., Colas F., Veldink J.H., de Kovel C.G.F., Janson E., Strengman E., Langfelder P., Kahn R.S., van den Berg L.H., Horvath S., Ophoff R.A. (2012) Genetic analysis of DNA methylation and gene expression levels in whole blood of healthy human subjects. *BMC Genomics.* **13**, 636.
 40. Díez-Villanueva A., Jordà M., Carreras-Torres R., Alonso H., Cordero D., Guinó E., Sanjuan X., Santos C., Salazar R., Sanz-Pamplona R., Moreno V. (2021) Identifying causal models between genetically regulated methylation patterns and gene expression in healthy colon tissue. *Clin. Epigenetics.* **13**, 162.
 41. Pierce B.L., Tong L., Argos M., Demanelis K., Jasmine F., Rakibuz-Zaman M., Sarwar G., Islam M.T., Shahriar H., Islam T., Rahman M., Yunus M., Kibriya M.G., Chen L.S., Ahsan H. (2018) Co-occurring expression and methylation QTLs allow detection of common causal variants and shared biological mechanisms. *Nat. Commun.* **9**, 804.
 42. Jin S.G., Kadam S., Pfeifer G.P. (2010) Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res.* **38**, e125.
 43. Field S.F., Beraldi D., Bachman M., Stewart S. K., Beck S., Balasubramanian S. (2015) Accurate measurement of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in human cerebellum DNA by oxidative bisulfite on an array (OxBS-array). *PLoS One.* **10**, e0118202.
 44. Qiao Y., Wang X., Wang R., Li Y., Yu F., Yang X., Song L., Xu G., Chin Y.E., Jing N. (2015) AF9 promotes hESC neural differentiation through recruiting TET2 to neurodevelopmental gene loci for methylcytosine hydroxylation. *Cell Discovery.* **1**, 1–19.
 45. Hinrichs A.S., Karolchik D., Baertsch R., Barber G.P., Bejerano G., Clawson H., Diekhans M., Furey T.S., Harte R.A., Hsu F., Hillman-Jackson J., Kuhn R.M., Pedersen J.S., Pohl A., Raney B.J., Rosenbloom K.R., Siepel A., Smith K.E., Sugnet C.W., Sultan-Qurraie A., Thomas D.J., Trumbower H., Weber R.J., Weirauch M., Zweig A.S., Haussler D., Kent W.J. (2006) The UCSC Genome Browser Database: update 2006. *Nucleic Acids Res.* **34**, D590–D598.
 46. Cobo I., Tanaka T.N., Mangalhara K.C., Lana A., Yeang C., Han C., Schlachetzki J., Challcombe J., Fixsen B.R., Sakai M., Li R.Z., Fields H., Mokry M., Tsai R.G., Bejar R., Prange K., de Winther M., Shadel G.S., Glass C.K. (2022) DNA methyltransferase 3 alpha and TET methylcytosine dioxygenase 2 restrain mitochondrial DNA-mediated interferon signaling in macrophages. *Immunity.* **55**, 1386–1401.e10.
 47. Quinlan A.R., Hall I.M. (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* **26**, 841–842.
 48. Statnikov A., Henaff M., Lytkin N.I., Aliferis C.F. (2012) New methods for separating causes from effects in genomics data. *BMC Genomics.* **13**(Suppl. 8), S22.
 49. Pfister N., Bühlmann P., Schölkopf B., Peters J. (2018) Kernel-based tests for joint independence. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **80**, 5–31.
 50. Zhang Y., Rohde C., Reinhardt R., Voelcker-Rehage C., Jeltsch A. (2009) Non-imprinted allele-specific DNA methylation on human autosomes. *Genome Biol.* **10**, R138.
 51. Shoemaker R., Deng J., Wang W., Zhang K. (2010) Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome. *Genome Res.* **20**, 883–889.
 52. Rahmani E., Schweiger R., Rhead B., Criswell L.A., Barcellos L.F., Eskin E., Rosset S., Sankararaman S., Halperin E. (2019) Cell-type-specific resolution epigenetics without the need for cell sorting or single-cell biology. *Nat. Commun.* **10**, 3417.
 53. Hackett J.A., Sengupta R., Zyllicz J.J., Murakami K., Lee C., Down T.A., Surani M.A. (2013) Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science.* **339**, 448–452.
 54. Romanova E.I., Zubritskiy A.V., Lioznova A.V., Ogunleye A.J., Golotin V.A., Guts A.A., Lennartsson A., Demidov O.N., Medvedeva Y.A. (2022) RUNX1/CEBPA mutation in acute myeloid leukemia promotes hypermethylation and indicates for demethylation therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(19), 11413.
 55. Haerter J.O., Lövkvist C., Dodd I.B., Sneppen K. (2014) Collaboration between CpG sites is needed for stable somatic inheritance of DNA methylation states. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2235–2244.
 56. Weinberg D.N., Papillon-Cavanagh S., Chen H., Yue Y., Chen X., Rajagopalan K.N., Horth C., McGuire J.T., Xu X., Nikbakht H., Lemiesz A.E., Marchione D.M., Marunde M.R., Meiners M.J., Cheek M.A., Keogh M.C., Bareke E., Djedid A., Harutyunyan A.S., Jabado N., Garcia B.A., Li H., Allis C.D., Majewski J., Lu C. (2019) The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. *Nature.* **573**, 281–286.
 57. Emperle M., Bangalore D.M., Adam S., Kunert S., Heil H.S., Heinze K.G., Bashtrykov P., Tessmer I., Jeltsch A. (2021) Structural and biochemical insight into the mechanism of dual CpG site binding and methylation by the DNMT3A DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **49**, 8294–8308.
 58. Jurkowska R.Z., Anspach N., Urbanke C., Jia D., Reinhardt R., Nellen W., Cheng X., Jeltsch A. (2008) Formation of nucleoprotein filaments by mammalian

- an DNA methyltransferase Dnmt3a in complex with regulator Dnmt3L. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6656–6663.
59. Jia D., Jurkowska R.Z., Zhang X., Jeltsch A., Cheng X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*. **449**, 248–251.
 60. Glass J.L., Fazzari M.J., Ferguson-Smith A.C., Greally J.M. (2009) CG dinucleotide periodicities recognized by the Dnmt3a-Dnmt3L complex are distinctive at retroelements and imprinted domains. *Mamm. Genome*. **20**, 633–643.
 61. Ginno P.A., Gaidatzis D., Feldmann A., Hoerner L., Imanci D., Burger L., Zilbermann F., Peters A.H.F.M., Edenhofer F., Smallwood S.A., Krebs A.R., Schübeler D. (2020) A genome-scale map of DNA methylation turnover identifies site-specific dependencies of DNMT and TET activity. *Nat. Commun.* **11**, 1–16.
 62. Suzuki T., Maeda S., Furuhashi E., Shimizu Y., Nishimura H., Kishima M., Suzuki H. (2017) A screening system to identify transcription factors that induce binding site-directed DNA demethylation. *Epigenetics Chromatin*. **10**, 60.
 63. Suzuki T., Shimizu Y., Furuhashi E., Maeda S., Kishima M., Nishimura H., Enomoto S., Hayashizaki Y., Suzuki H. (2017) RUNX1 regulates site specificity of DNA demethylation by recruitment of DNA demethylation machineries in hematopoietic cells. *Blood Adv.* **1**, 1699–1711.
 64. Thurman R.E., Rynes E., Humbert R., Vierstra J., Maurano M.T., Haugen E., Sheffield N.C., Stergachis A.B., Wang H., Vernot B., Garg K., John S., Sandstrom R., Bates D., Boatman L., Canfield T.K., Diegel M., Dunn D., Ebersol A.K., Frum T., Giste E., Johnson A.K., Johnson E.M., Kutayavin T., Lajoie B., Lee B.K., Lee K., London D., Lotakis D., Neph S., Neri F., Nguyen E.D., Qu H., Reynolds A.P., Roach V., Safi A., Sanchez M.E., Sanyal A., Shaffer A., Simon J.M., Song L., Vong S., Weaver M., Yan Y., Zhang Z., Zhang Z., Lenhard B., Tewari M., Dorschner M.O., Hansen R.S., Navas P.A., Stamatoyannopoulos G., Iyer V.R., Lieb J.D., Sunyaev S.R., Akey J.M., Sabo P.J., Kaul R., Furey T.S., Dekker J., Crawford G.E., Stamatoyannopoulos J.A. (2012) The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature*. **489**, 75–82.
 65. Wang H., Maurano M.T., Qu H., Varley K.E., Gertz J., Pauli F., Lee K., Canfield T., Weaver M., Sandstrom R., Thurman R.E., Kaul R., Myers R.M., Stamatoyannopoulos J.A. (2012) Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* **22**, 1680–1688.
 66. de Mendoza A., Nguyen T.V., Ford E., Poppe D., Buckberry S., Pflueger J., Grimmer M.R., Stolzenburg S., Bogdanovic O., Oshlack A., Farnham P.J., Blancafort P., Lister R. (2022) Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. *Genome Biol.* **23**, 1–31.

CpG Traffic Lights are Involved in Active DNA Demethylation

A. V. Lioznova¹, Yu. A. Medvedeva^{1, *}

¹Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: ju.medvedeva@gmail.com

DNA methylation is one of the most important mechanisms involved in the epigenetic regulation of gene expression. However, the relationship between DNA methylation and expression is still not fully understood. There are examples where changes in DNA methylation level cause changes in gene expression, and vice versa – changes in expression entail changes in the methylation level. Earlier, we introduced the concept of CpG traffic lights, individual CpG sites whose methylation significantly correlates with expression, and showed their important role in enhancer regulation. Here, we showed that the methylation levels of CpG traffic lights are heterogeneous in the cell population and suggested that this is due to their dynamic demethylation. The observed enrichment of CpG traffic lights with 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and TET2 (Tet methylcytosine dioxygenase 2) localization sites has now confirmed our hypothesis. In order to find out whether the methylation of CpG sites is a cause or a consequence of the expression of the corresponding gene, we applied the method of causal inference. As a result, among the CpG sites, we distinguished those for which methylation was the cause of expression changes and those for which expression changes caused methylation changes. CpG sites of the first type were characterized by more stable methylation levels in different cells and less pronounced demethylation compared to CpG sites of the second type. It was also shown that the proportion of CpG sites whose methylation affected expression was greater in promoter regions than in the gene body, for which methylation was likely to be a consequence of expression. Based on these observations, we can assume that the methylation levels of CpG sites, which determine the expression of the gene associated with them, are stable and work on the principle of a “switch”. Conversely, for expression-dependent CpG sites, methylation levels are dynamic and vary between cells in the population, primarily due to active demethylation.

Keywords: DNA methylation, CpG sites, gene expression, epigenetic regulation, causal inference

ПРИМЕНЕНИЕ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МТТ-ТЕСТА

© 2024 г. В. А. Мушенков^{а, *}, Д. А. Лукьянов^{а, b}, Н. Ф. Мещерякова^а,
В. И. Кукушкин^с, Е. Г. Завьялова^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^bЦентр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

^сИнститут физики твердого тела им. Ю.А. Осипяна Российской академии наук, Московская область, Черноголовка, 142432 Россия

*e-mail: vladimir.mushenkov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.06.2024 г.

После доработки 02.07.2024 г.

Принята к публикации 10.07.2024 г.

В настоящее время при лечении инфекционных заболеваний часто применяют эмпирические схемы терапии, не основанные на данных о резистентности возбудителя. Одна из главных причин необоснованного назначения антибактериальных препаратов – отсутствие быстрых и в то же время универсальных методов определения антибиотикорезистентности патогена. Наиболее широко применяемые культуральные технологии, такие как метод микроразведений, требуют длительного времени для наращивания нужного количества бактериальных клеток. Менее времязатратные методы оценки резистентности (геномные или протеомные) базируются на определении специфических маркеров (генов устойчивости, сверхэкспрессии определенных белков и др.); при этом конкретный протокол чаще всего применим к узкому числу как штаммов микроорганизмов, так и антибиотиков. Ранее нами продемонстрирована возможность применения технологии спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света для количественного определения продукта жизнедеятельности бактериальных клеток в МТТ-тесте – формазана, – причем напрямую, в клеточной суспензии. Отсутствие стадии выделения формазана упрощает анализ и повышает его точность. Время проведения исследования не превышало 2 ч при сохранении универсальности самого МТТ-теста. К ограничениям разработанного протокола по КР-детекции результатов МТТ-теста следует отнести высокий порог чувствительности по концентрации бактериальных клеток – 10^7 КОЕ/мл, в связи с чем образцы с низким содержанием бактерий проходят предварительную стадию культивирования. Здесь мы предлагаем способ повышения чувствительности определения формазана за счет использования эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) на наночастицах золота. В результате проведенного исследования подобраны оптимальные условия проведения ГКР-спектроскопии формазана как в растворе, так и в суспензии клеток *Escherichia coli*. Усиление сигнала формазана за счет применения ГКР на наночастицах золота позволило снизить порог чувствительности по числу бактериальных клеток в образце не менее чем в 30 раз – до 3×10^5 КОЕ/мл. Такая чувствительность не предел возможности разработанного протокола ГКР – введение в эксперимент других типов наночастиц, например оптимизированных по форме, размеру, концентрации, может дать дополнительное усиление ГКР-сигнала.

Ключевые слова: МТТ-тест, формазан, комбинационное рассеяние света, гигантское комбинационное рассеяние, наночастицы золота, *Escherichia coli*, бактерии, антибиотикорезистентность

DOI: 10.31857/S0026898424060134, **EDN:** IAFGAM

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость к противомикробным препаратам была отнесена Всемирной организацией здравоохранения к числу 10 главных проблем медицины еще в XX веке [1]. Устойчивые к препаратам инфекции стали причиной (прямой или косвенной) 4.95 млн. смертей в 2019 г. [2]. Если не будут приняты меры по сдерживанию распространения лекарственно устойчивых инфекций, они станут самой частой причиной смертности к 2050 году, вызывая более 10 млн. смертей ежегодно [3]. Устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам развивается очень быстро из-за широкого применения антибиотиков в различных сферах деятельности человека [4]. Практически ко всем используемым антибиотикам у бактерий развивается резистентность, в том числе и к недавно вошедшим в клиническую практику. Так, последний принципиально новый класс антибиотиков был открыт в 1986 г. — в результате выделения дактиномицина из почвенных микроорганизмов — и впоследствии одобрен для клинического использования [5].

Устойчивые к антибиотикам микроорганизмы вызывают тяжелые, трудноизлечимые заболевания, отличающиеся от чувствительных возбудителей более длительным течением и повышенной летальностью [6]. Наибольшую опасность представляют мультирезистентные бактерии, такие как метициллинрезистентный золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), смертность от которого достигает 38% [7, 8]. При лечении тяжелых бактериальных инфекций важно своевременно начать этиотропное лечение. В клинической практике часто применяют эмпирические схемы медикаментозной терапии, не основанные на данных о резистентности инфекционного агента. Эмпирические схемы позволяют быстро начать лечение, что важно при тяжелом течении заболевания [9], однако они часто оказываются неэффективными [10, 11] или приводят к ухудшению состояния пациента [12]. Одна из причин выбора

эмпирических методик терапии — длительность проведения анализов на антибиотикорезистентность. Для этого чаще всего используют культуральные методы [13] (диско-диффузионный, микроразведений, Е-тест, автоматизированные тест-системы), главное ограничение которых заключается в необходимости культивирования клинического бактериального изолята [14]. Есть более быстрые методы определения антибиотикорезистентности, в том числе основанные на идентификации генов устойчивости методом ПЦР (например, GeneXpert MTB/RIF — тест на устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину [15]). Однако ограничения есть и у этих методов. Так, протокол молекулярно-генетического анализа обычно предназначен для исследования конкретного микроорганизма или антибиотика и не подходит для других патогенов. Кроме того, идентифицированный ген антибиотикорезистентности может нести мутацию или быть функционально неактивным, что приведет к ложноположительному результату [14].

Оценка метаболической активности бактерий с использованием МТТ-теста. МТТ-тест основан на ферментативном восстановлении тетразолиевых солей, обычно 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолбромид (МТТ), до соответствующих формазановых красителей (рис. 1).

Восстановление МТТ катализируется NADH-зависимыми оксидоредуктазами, активность которых напрямую зависит от метаболизма клетки, поэтому по скорости реакции и количеству полученного формазана можно определить жизнеспособность исследуемых клеток. МТТ вводят в клеточную суспензию и через определенное время детектируют образовавшийся формазан спектрофотометрически, предварительно экстрагировав его органическими растворителями [16]. Наиболее широко МТТ-тест используют для оценки жизнеспособности эукариотических клеток [17], в том числе при исследовании цитотоксичности потенциальных лекарственных средств

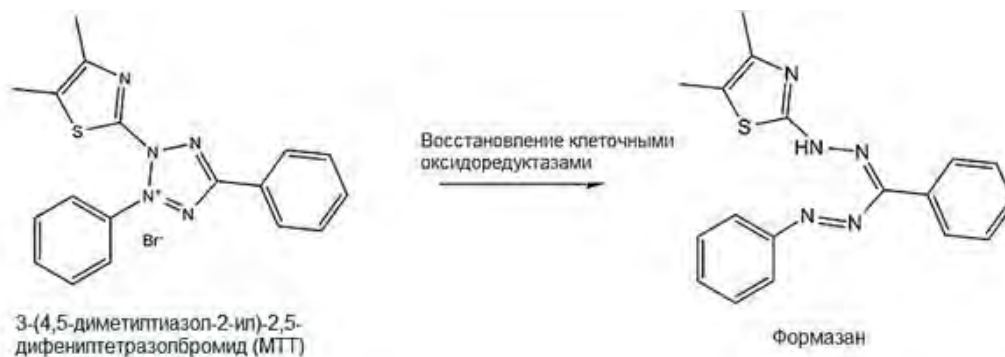


Рис. 1. Реакция восстановления МТТ.

[18, 19], пролиферативной активности клеток [20, 21], чувствительности злокачественных опухолей к химиопрепаратам [22, 23] и других. Несмотря на тот факт, что механизм восстановления тетразолов в клетках прокариот изучен плохо, в настоящее время МТТ-тест используют и для прокариот [24]: идентификации резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* [25, 26], поиска соединений с антибактериальной активностью [27, 28], анализа биопленкообразования [29], антибактериальной активности нейтрофилов [30, 31].

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР; англ. эквивалент – Raman spectroscopy) – не разрушающий образцы, высокоспецифичный метод детекции соединений, основанный на неупругом (комбинационном) рассеянии света. Рассеянный таким образом свет отличается по энергии от изначального, величина сдвига дает информацию о колебательных модах в системе [32]. Рамановская спектроскопия позволяет получать “отпечатки пальцев”, уникальные для каждого соединения и отражающие его структуру. Именно поэтому спектроскопию КР широко используют для изучения структурных превращений биомолекул [33, 34], детекции онкомаркеров [35–37], идентификации микроорганизмов [38, 39]. Низкая интенсивность КР-света может служить ограничением метода там, где требуется высокая чувствительность.

Определение формазана в МТТ-тесте методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) вместо традиционного спектрофотометрического метода имеет ряд преимуществ. Так, высокая специфичность КР позволяет определять формазан непосредственно в образце и тем самым исключить стадию экстракции формазана органическими растворителями. Это упрощает процесс пробоподготовки и позволяет избежать осаждения белков органическими растворителями, что искажает оптические характеристики исследуемого образца [40]. Спектрофотометрический метод примерно на два порядка [41] менее чувствителен, чем спектроскопия ГКР, поэтому для образования достаточного для анализа количества формазана требуется длительная инкубация бактерий с МТТ, особенно в случае медленно растущих штаммов [24].

Интенсивность и число характеристических полос формазана и МТТ в спектрах ГКР зависят от выбора длины волны возбуждающего излучения. МТТ имеет наиболее интенсивный спектр при облучении коротковолновым синим (325 нм) лазером, тогда как для определения формазана оптимальны красный (633 нм) лазер [41]. Вследствие того, что длина волны красного лазера близка к максимуму оптического поглощения формазана, возникает эффект резонансного КР, прояв-

ляющийся в увеличении интенсивности характеристических полос формазана и появлению дополнительных. В спектрах МТТ и формазана интенсивность полос со сдвигом 992 и 967 см^{-1} соответственно имеет линейную зависимость от концентрации (для формазана при облучении лазером с длиной волны 633 нм такую зависимость имеет также полоса 722 см^{-1}). Таким образом, эти полосы могут быть использованы для количественного определения этих двух соединений [42].

Определение антибиотикорезистентности. Ранее нами разработан быстрый метод определения антибиотикорезистентности на основе МТТ-теста для прокариот (см. “Экспериментальная часть”), который основан на изменении количества формазана, вырабатываемого бактериями, вследствие подавления их жизнедеятельности антибактериальными препаратами. Скорость изменения активности бактерий под действием антибиотиков достаточно высокая, поэтому достоверные различия в выработке формазана чувствительными и устойчивыми штаммами регистрируют в течение 30–60 мин после введения антибиотика. К преимуществам метода относятся небольшая длительность анализа (всего 1–2 ч) и универсальность (применим для широкого спектра бактерий и антибактериальных препаратов). Использование метода КР для определения формазана непосредственно в образце упрощает проведение анализа за счет снижения его стадийности и переноса оборудования и реактивов.

Ограничительный фактор – низкая чувствительность спектроскопии КР. Так, минимальная концентрация бактериальных клеток, при которой вырабатывается достаточное для измерения количество формазана, составляет 1×10^7 КОЕ/мл. Такого количества вполне достаточно для измерения подготовленных препаратов клеток (например, ночных культур), но не для клинических образцов. Так, в образцах мочи клинически значимая концентрация бактерий составляет в среднем 10^4 – 10^5 КОЕ/мл [43], а при инфекциях крови – 1–100 клеток/мл [44]. Таким образом, для определения антибиотикорезистентности бактерий в таких образцах необходимо либо вводить стадию культивирования, что усложняет анализ и увеличивает его длительность, либо повышать чувствительность детекции формазана.

Для повышения чувствительности КР-анализа применяют ГКР, или SERS (Surface-Enhanced Raman spectroscopy) [45]. Спектроскопия ГКР основана на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, возникающем на шероховатых металлических структурах, в качестве которых часто используются наночастицы серебра или золота. Эффект ГКР проявляется на небольшом расстоянии от поверхности [46], однако обладает очень

большим (до 10^{14}) фактором усиления, позволяя детектировать в отдельных случаях единичные молекулы [47]. В работах Z. Мао с соавт. [41, 42] описана методика определения формазана, образующегося в эукариотическом МТТ-тесте, с использованием в качестве субстрата ГКР наночастиц золота, синтезированных из тетрахлорауроной кислоты и цитрата натрия. Эти наночастицы эффективно усиливали сигнал формазана при облучении красным светом, то есть при анализе его спектра также регистрировали эффект резонансного КР, дополнительно увеличивающий чувствительность детектора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Тетразолиевый краситель МТТ (“ДИА-М”, Россия) разводили до концентрации 4 мг/мл в воде и хранили при 4°C . Состав PBS (pH 7.2): 0.8% NaCl, 0.02% KH_2PO_4 , 0.02% KCl, 0.12% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Стерильную жидкую форму среды LB (“Condalab”, Италия) готовили по протоколу, рекомендованному производителем: 4 г сухой смеси LB растворяли в 200 мл воды и автоклавировали 15 мин при 121°C .

Инструменты, параметры измерения. Для получения спектров КР и ГКР использовали спектрометр Фотон-Био RL638 (“Фотон-Био”, Россия) с длиной волны лазера 638 нм и мощностью излучения 100 мВт. Параметры измерения: экспозиция 1000 мс, 10 повторов, мощность лазера (ШИМ) 70%. Измерения проводили в кюветах с рабочим объемом 500 мкл. Спектры обрабатывали скриптом на Python3 алгоритмами Уиттакера [48] и асимметричного взвешенного сглаживания по методу наименьших квадратов [49].

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ЭКРОС 5400УФ (“Экрос”, Россия).

Получение наночастиц золота. Наночастицы золота получали по методике G. Frens [50]. К 30 мл воды добавляли 347.6 мкл 25.4 mM HAuCl_4 , нагревали до кипения, вносили 126 мкл 1%-ного водного раствора цитрата натрия и кипятили смесь еще 40 мин. Получали раствор бордового цвета (pH 6.0), содержащий наночастицы золота диаметром 45–50 нм (оптимальный размер для ГКР-спектроскопии [51]). Спектр поглощения раствора наночастиц после синтеза представлен на рис. S1 (см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Mushenkov_rus.pdf).

МТТ-тест и пробоподготовка формазана для ГКР-анализа. Ночную культуру клеток *Escherichia coli*, штамм dl1 (1 мл), обрабатывали 200 мкл рас-

твора МТТ и инкубировали 1 ч при 37°C , после чего клеточную суспензию центрифугировали при 12400 g в течение 1 мин. К осадку добавляли 2 мл изопропилового спирта, тщательно перемешивали и центрифугировали в тех же условиях. Супернатант отбирали и разбавляли в два раза изопропанолом. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 570 нм и доводили до 4 о.е. (соответствует концентрации формазана 0.13 г/л) [52].

Подготовка культуры клеток для ГКР-анализа. Ночные культуры бактерий *E. coli* JW5503 Δ tolC [53] растили в течении 8 ч в инкубаторе при 37°C , после чего разбавлялись средой LB до конечной концентрации 6×10^8 КОЕ/мл ($\text{OD}_{600} = 0.451$) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C .

Определения антибиотикорезистентности бактериальных штаммов и минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Этот протокол включал несколько этапов.

1. Исследуемые штаммы бактерий (концентрация 2 по МакФарланду) разбавляли свежей средой LB и инкубировали при 37°C в течение 1 ч.

2. Пятьдесят микролитров клеточной суспензии вносили в кювету с фосфатным буфером (PBS), содержащим антибиотик (конечный объем реакционной смеси – 400 мкл), и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Использовали увеличивающиеся концентрации антибиотика и отрицательный контроль (PBS без антибиотика).

3. После инкубации добавляли 100 мкл МТТ (4 мкг/мл), инкубировали 20 мин и измеряли интенсивность пика 967 см^{-1} (формазан) на КР-спектрометре. Интенсивность этого пика для контрольного образца (без антибиотика) принимали за 100%; значения, полученные для опытных образцов, нормировали по контролю. Концентрация антибиотика, при которой интенсивность сигнала формазана резко снижалась (до 40–60% от контроля), принимали за минимальную концентрацию ингибирования (МИК) данного антибиотика. Подробное описание метода приведено в патентной заявке № 2023129249 от 13.11.2023.

КР- и ГКР-анализ спектра формазана в культуре клеток. Для получения спектров КР использовали вышеприведенную методику. К 50 мкл культуры бактериальных клеток добавляли 350 мкл PBS, 100 мкл раствора МТТ и инкубировали в течение 20 мин. Смесь переносили в кювету и регистрировали КР-спектр.

Для анализа спектра ГКР отбирали 200 мкл клеточной суспензии, добавляли 100 мкл изопропилового спирта и перемешивали, после чего вносили 300 мкл суспензии наночастиц золота,

инкубировали 5 мин при комнатной температуре и регистрировали ГКР-спектр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий ГКР-спектроскопии для регистрации формазана

Для определения оптимальных условий регистрации ГКР-спектра формазана варьировали концентрацию наночастиц и время инкубации и выбирали такие, при которых усиление сигнала было максимальным.

Различные объемы (от 0 до 400 мкл) наночастиц золота вносили в раствор формазана (5 мкл с концентрацией 0.13 г/л) в рассчитанном объеме PBS – таком, чтобы конечный объем смеси

составлял 500 мкл. После 3 мин инкубации регистрировали спектр ГКР и оценивали интенсивность полос 722 и 967 см^{-1} . Максимальное усиление сигнала детектировали для образца, содержащего 300 мкл наночастиц, при дальнейшем увеличении их концентрации интенсивность сигнала снижалась (рис. 2).

В связи с тем, что интенсивность ГКР-спектра зависела и от времени инкубации формазана с наночастицами золота, мы проанализировали и этот параметр. Для этого подготовили ряд образцов, добавляя к 5 мкл раствора формазана (0.13 г/л) в 195 мкл фосфатного буфера 300 мкл наночастиц. Образцы инкубировали в течение различных промежутков времени, отбирая аликвоты с шагом в 1 мин, и регистрировали спектры ГКР. Как видно на рис. 3, интенсивность сигнала быстрее всего нарастала в течение первых 3 мин, в интервале 3–7

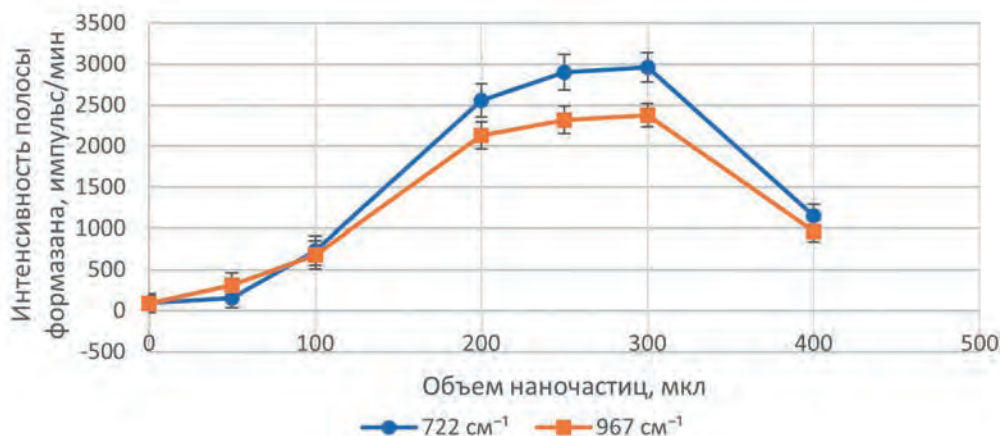


Рис. 2. Подбор концентрации наночастиц золота для усиления сигнала формазана в ГКР-спектре.

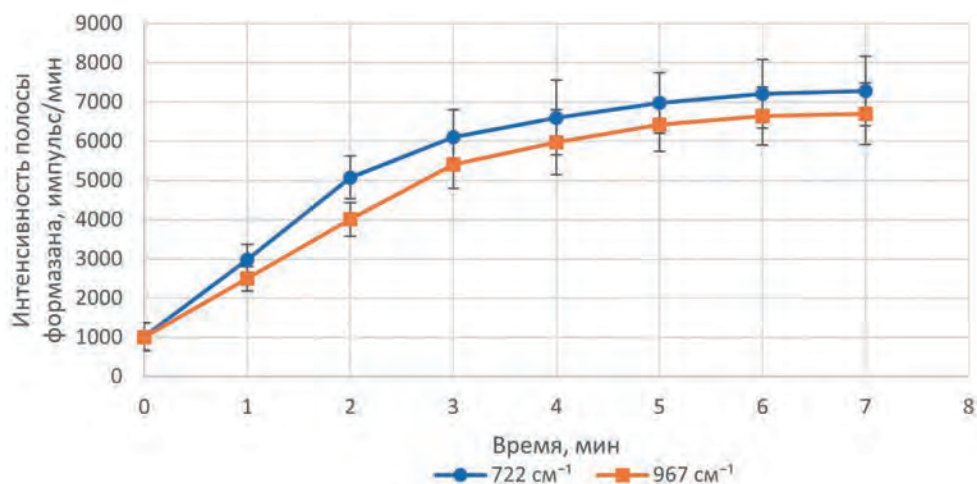


Рис. 3. Подбор времени инкубации формазана с наночастицами золота для усиления сигнала в ГКР-спектре.

мин скорость роста постепенно замедлялась, а при длительной инкубации, 20–30 мин, снижалась из-за агрегации наночастиц (*результаты не представлены*). Для дальнейших экспериментов по анализу жизнеспособности бактериальных клеток был выбран 5-минутный период инкубации исследуемых образцов с наночастицами.

Оптимальное разрешение полос получено в следующих условиях пробоподготовки: 5 мкл (0.13 г/л) раствора формазана в 195 мкл PBS в присутствии 300 мкл суспензии наночастиц, время инкубации – 5 мин. Полученный спектр имел интенсивные характеристические полосы формазана, отмеченные на рис. 4.

Сравнение чувствительности спектроскопии ГКР и КР для формазана

Эффект ГКР был оценен прямым сравнением интенсивности спектра формазана в присутствии золотых наночастиц и без них. Для этого к различным объемам формазана добавляли PBS до объема 200 мкл, затем 300 мкл наночастиц (в случае ГКР) или 300 мкл PBS (в случае КР). Спектры были сняты после инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре. На рис. 5 приведено сравнение интенсивностей полосы 967 см^{-1} .

Для ГКР-спектра наиболее выраженное, приблизительно 50-кратное, усиление сигнала регистрировали в области низких концентраций формазана (до 2 мкг/мл); при повышении кон-

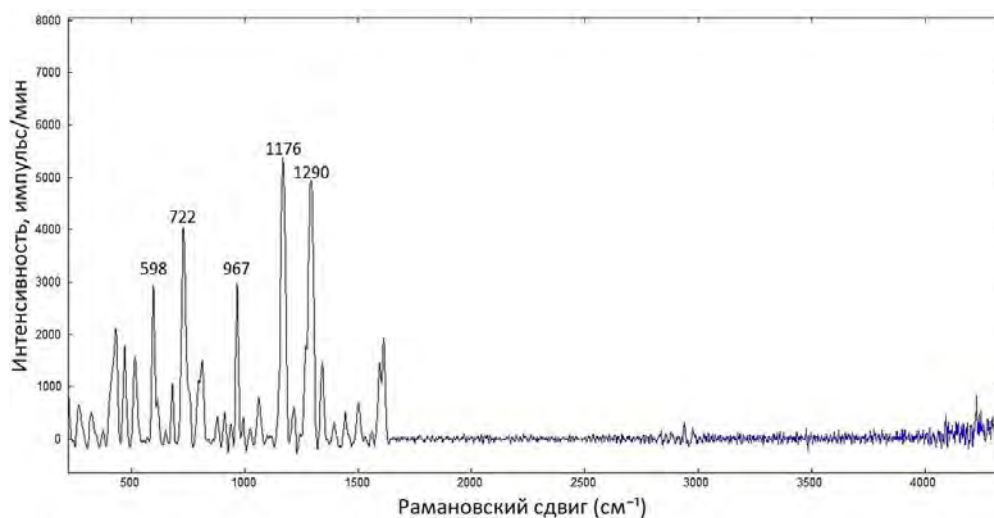


Рис. 4. ГКР-спектр формазана (концентрация 1.25 мкг/мл). Характеристические пики формазана подписаны; длина волны возбуждающего излучения – 638 нм.

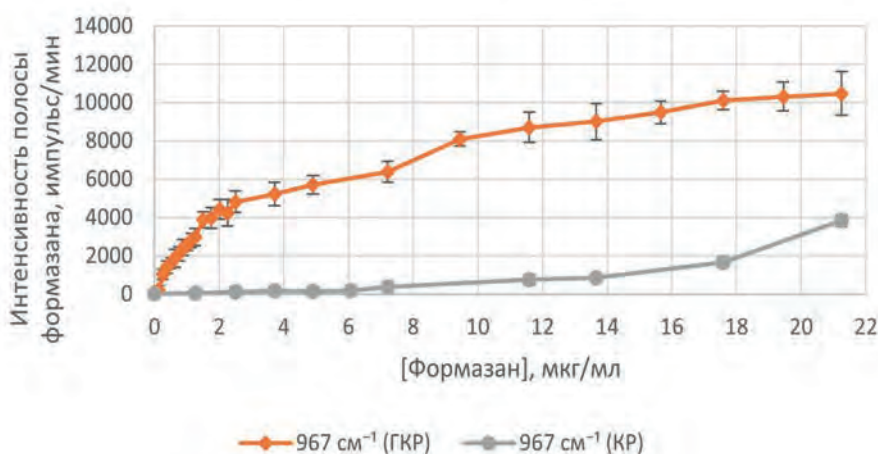


Рис. 5. Сравнительный анализ ГКР- и КР-спектров формазана.

Таблица 1. Сравнение интенсивности пика формазана при 967 см^{-1} в спектрах КР и ГКР

Метод	[Формазан], мкг/мл			
	при интенсивности сигнала, импульс/мин			
	500	1 000	2 000	4 000
КР	11.00	14.50	17.50	21.00
ГКР	0.17	0.25	0.38	1.20
Усиление (КР/ГКР)	65	58	46	17

центрации интенсивность усиления снижалась, но оставалась на уровне, значимо превышающем сигнал КР-спектра. В случае ГКР предел обнаружения формазана составил 0.1 мкг/мл, в то время как для спектроскопии без усиления – 7 мкг/мл, то есть в 70 раз больше (табл. 1).

Измерение ГКР-спектра бактерий

В отличие от раствора формазана, при добавлении наночастиц к образцам бактерий, обработанных МТТ, усиления сигнала за счет ГКР практически не было. Дело в том, что эффективность ГКР быстро падает с увеличением расстояния от рассеивающей свет молекулы до поверхности наночастицы [54]. Добавляемый в ходе МТТ-теста тетразол восстанавливается внутри клеток и образующийся формазан накапливается внутри них (наружу формазан выходит лишь при высокой

концентрации – когда формируемые им игольчатые кристаллы разрушают клетки) [55], поэтому наночастицы, находящиеся вне клеток, не могут оказаться достаточно близко к формазану для формирования ГКР-сигнала. Следовательно, для измерения спектра ГКР формазана в бактериях их необходимо предварительно лизировать – чтобы формазан вышел наружу и смог контактировать с поверхностью наночастиц. Ранее для эукариотических клеток было предложено использовать классическую методику проведения МТТ-теста, но без стадии выделения формазана. Так, к образцам после инкубации с МТТ добавляли ДМСО и непосредственно после добавления наночастиц проводили измерения [41].

Нами предложена модификация методики МТТ-теста с целью получения ГКР-спектра формазана в прокариотических клетках. Для лизиса

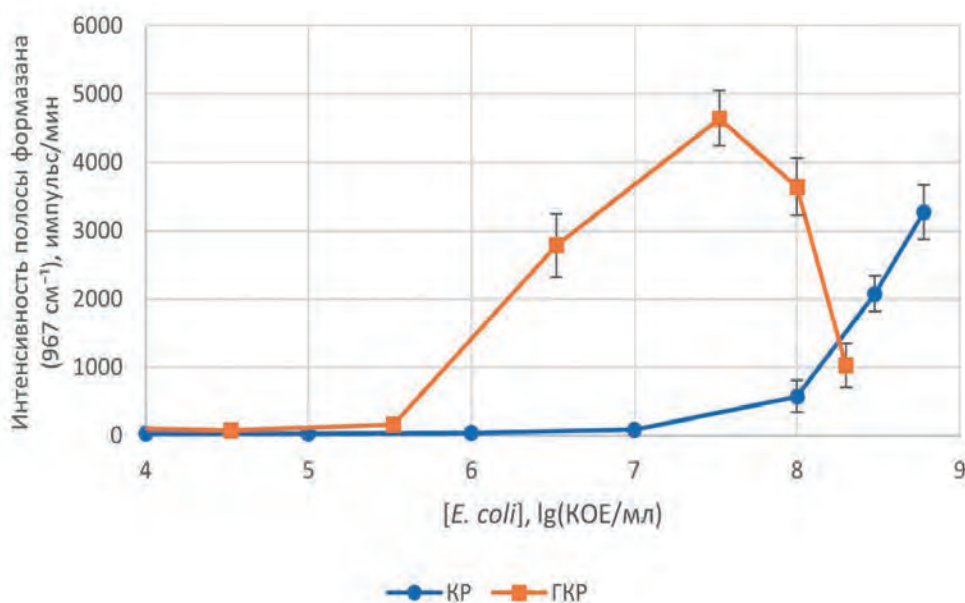


Рис. 6. Сравнение чувствительности ГКР- и КР-спектроскопии для определения концентрации формазана, образовавшегося из МТТ в жизнеспособных клетках *E. coli*.

клеток *E. coli* был выбран изопропиловый спирт и подобран его оптимальный объем, соответствующий максимальному усилению интенсивности сигнала формазана. Изопропиловый спирт эффективно высвобождал формазан из клеток *E. coli*, при этом не влиял на свойства наночастиц и не искажал спектр формазана (рис. S1—S4, табл. S1; см. электронное приложение). Результаты сравнения спектров формазана, полученных ГКР- и КР-спектроскопией, приведены на рис. 6.

В результате проведенного анализа выявлено, что пороговое значение концентрации клеток *E. coli* в МТТ-тесте составило 3×10^5 КОЕ/мл в случае ГКР-спектроскопии и 1×10^7 КОЕ/мл для КР. Таким образом, благодаря применению наночастиц золота нам удалось снизить минимальную концентрацию анализируемых клеток в 30 раз. Интенсивность сигнала формазана в ГКР-спектре достигла максимума при концентрации бактериальных клеток 3×10^7 КОЕ/мл и резко снижалась при дальнейшем увеличении концентрации клеток, что сопровождалось агрегацией наночастиц и обесцвечиванием раствора.

Таким образом, нами была рассмотрена возможность повышения чувствительности определения формазана, образующегося в МТТ-тесте, при помощи ГКР-активных наночастиц золота. По сравнению с КР-спектроскопией ГКР на наночастицах золота имеет существенно более низкий предел обнаружения формазана и позволяет снизить минимальную концентрацию клеток *E. coli* до 3×10^5 КОЕ/мл в МТТ-тесте. Это значит, что теперь МТТ-тест можно использовать для анализа жизнеспособности образцов с низким содержанием бактериальных клеток — без предварительного их накопления культивированием.

Дальнейшее повышение чувствительности определения формазана — продукта жизнедеятельности клеток в МТТ-тесте — возможно за счет модификации поверхности наночастиц или изменения их формы/размера. Применение ГКР-спектроскопии для детекции результатов МТТ-теста при анализе антибиотикорезистентности бактерий позволит быстро и точно определять этот параметр и оперативно разрабатывать персонализированную схему лечения инфекционных заболеваний.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-65-00015, <https://rscf.ru/project/24-65-00015/>).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walsh T.R., Gales A.C., Laxminarayan R., Dodd P.C. (2023) Antimicrobial resistance: addressing a global threat to humanity. *PLoS Med.* **20**(7), e1004264.
- Ranjbar R., Alam M. (2024) Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). (2023) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Evid. Based Nurs.* **2023**, ebnurs-2022–103540. <https://doi.org/10.1136/ebnurs-2022-103540>
- O'Neill J. (2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. <https://apo.org.au/node/63983>
- Klein E.Y., Van Boeckel T.P., Martinez E.M., Pant S., Gandra S., Levin S.A., Goossens H., Laxminarayan R. (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**(15), E3463–E3470.
- Durand G.A., Raoult D., Dubourg G. (2019) Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **53**(4), 371–382.
- de Kraker M.E.A., Lipsitch M. (2021) Burden of antimicrobial resistance: compared to what? *Epidemiol. Rev.* **43**(1), 53–64.
- Hanberger H., Walther S., Leone M., Barie P.S., Rello J., Lipman J., Marshall J.C., Anzueto A., Sakr Y., Pickkers P. (2011) Increased mortality associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in the Intensive Care Unit: results from the EPIC II study. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **38**(4), 331–335.
- Yang C.C., Sy C.L., Huang Y.C., Shie S.S., Shu J.C., Hsieh P.H., Hsiao C.H., Chen C.J. (2018) Risk factors of treatment failure and 30-day mortality in patients with bacteremia due to MRSA with reduced vancomycin susceptibility. *Sci. Rep.* **8**(1), 7868.
- Dellinger R.P., Levy M.M., Carlet J.M., Bion J., Parker M.M., Jaeschke R., Reinhart K., Angus D.C., Brun-Buisson C., Beale R. (2008) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit. Care Med.* **36**(1), 296–327.
- Chen H.C., Lin W.L., Lin C.C., Hsieh W.H., Hsieh C.H., Wu M.H., Wu J.Y., Lee C.C. (2013) Outcome of inadequate empirical antibiotic therapy in emergency department patients with community-onset bloodstream infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**(4), 947–953.
- Dickinson J.D., Kollef M.H. (2011) Early and adequate antibiotic therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **13**, 399–405.
- Goneau L.W., Delport J., Langlois L., Poutanen S.M., Razvi H., Reid G., Burton J.P. (2020) Issues beyond resistance: inadequate antibiotic therapy and bacterial hypervirulence. *FEMS Microbes.* **1**(1), xtaa004.
- Reller L.B., Weinstein M., Jorgensen J.H., Ferraro M.J. (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* **49**(11), 1749–1755.

14. Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. (2019) Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics* (Basel). **9**(2), 49.
15. Steingart K.R., Schiller I., Horne D.J., Pai M., Boehme C.C., Dendukuri N. (2014) Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**(1), CD009593.
16. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. (2018) Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**(6), pdb-prot095505.
17. Van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. (2011) Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 237–245.
18. Bahuguna A., Khan I., Bajpai V.K., Kang S.C. (2017) MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangl. J. Pharm.* **12**(2), 115–118.
19. Tolosa L., Donato M. T., Gómez-Lechón M. J. (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **2015**, 333–348.
20. Weichert H., Blechschmidt I., Schröder S., Ambrosius H. (1991) The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). *Allerg. Immunol.* (Leipzig). **37**(3–4), 139–144.
21. Molaee N., Mosayebi G., Pishdadian A., Ejtehadifar M., Ganji A. (2017) Evaluating the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells using MTT assay. *Int. J. Basic Sci. Med.* **2**(1), 25–28.
22. Cole S.P.C. (1986) Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **17**(3), 259–263.
23. Campling B.G., Pym J., Baker H.M., Cole S.P.C., Lam Y.M. (1991) Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *Br. J. Cancer.* **63**(1), 75–83.
24. Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. (2018) Current methodology of MTT assay in bacteria — a review. *Acta Histochem.* **120**(4), 303–311.
25. Montoro E., Lemus D., Echemendia M., Martin A., Portaels F., Palomino J.C. (2005) Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**(4), 500–505.
26. Mshana R.N., Tadesse G., Abate G., Miörner H. (1998) Use of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **36**(5), 1214–1219.
27. Moodley S., Koorbanally N.A., Moodley T., Ramjugernath D., Pillay M. (2014) The 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, -5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, screening test for the *in vitro* anti-tuberculous activity of chalcones. *J. Microbiol. Methods.* **104**, 72–78.
28. Shi L., Ge H.M., Tan S.H., Li H.Q., Song Y.C., Zhu H.L., Tan R.X. (2007) Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. *Eur. J. Med. Chem.* **42**(4), 558–564.
29. Brambilla E., Ionescu A., Cazzaniga G., Edefonti V., Gagliani M. (2014) The influence of antibacterial toothpastes on *in vitro* *Streptococcus mutans* biofilm formation: a continuous culture study. *Am. J. Dent.* **27**(3), 160–166.
30. Stevens M.G., Olsen S.C. (1993) Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *J. Immunol. Methods.* **157**(1–2), 225–231.
31. Stevens M.G., Kehrl J. M.E., Canning P.C. (1991) A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **28**(1), 45–56.
32. Kudelski A. (2008) Analytical applications of Raman spectroscopy. *Talanta.* **76**(1), 1–8.
33. Kuhar N., Sil S., Umapathy S. (2021) Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **258**, 119712.
34. Martinez M.G., Bullock A.J., MacNeil S., Rehman I.U. (2019) Characterisation of structural changes in collagen with Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* **54**(6), 509–542.
35. Beljebbar A., Bouché O., Diébold M.D., Guillou P.J., Palot J.P., Eudes D., Manfait M. (2009) Identification of Raman spectroscopic markers for the characterization of normal and adenocarcinomatous colonic tissues. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **72**(3), 255–264.
36. Depciuch J., Kaznowska E., Zawlik I., Wojnarowska R., Cholewa M., Heraud P., Cebulski J. (2016) Application of Raman spectroscopy and infrared spectroscopy in the identification of breast cancer. *Appl. Spectrosc.* **70**(2), 251–263.
37. Chan J.W., Taylor D.S., Lane S.M., Zwerdling T., Tuscano J., Huser T. (2008) Nondestructive identification of individual leukemia cells by laser trapping Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **80**(6), 2180–2187.
38. Pahlow S., Meisel S., Cialla-May D., Weber K., Rösch P., Popp J. (2015) Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **89**, 105–120.
39. Stöckel S., Kirchhoff J., Neugebauer U., Rösch P., Popp J. (2016) The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms. *J. Raman. Spectrosc.* **47**(1), 89–109.
40. Riss T. (2017) Is your MTT assay really the best choice? Promega Corporation website <http://www.promega.in/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/>
41. Mao Z., Liu Z., Chen L., Yang J., Zhao B., Jung Y.M., Wang X., Zhao C. (2013) Predictive value of the surface-enhanced resonance Raman scattering-based MTT assay: a rapid and ultrasensitive method for cell viability *in situ*. *Anal. Chem.* **85**(15), 7361–7368.
42. Mao Z., Liu Z., Yang J., Han X., Zhao B., Zhao C. (2018). *In situ* semi-quantitative assessment of single-cell viability by resonance Raman spectroscopy. *Chem. Commun. (Camb.)*. **54**(52), 7135–7138.

43. Wilson M.L., Gaido L. (2004) Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin. Infect. Dis.* **38**(8), 1150–1158.
44. Lamy B., Dargère S., Arendrup M.C., Parienti J.J., Tattevin P. (2016) How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art. *Front. Microbiol.* **7**, 191111.
45. Stiles P.L., Dieringer J.A., Shah N.C., Van Duyne R.P. (2008) Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 601–626.
46. Bell S.E.J., Charron G., Cortés E., Kneipp J., de la Chapelle M.L., Langer J., Procházka M., Tran V., Schlücker S. (2020) Towards reliable and quantitative surface-enhanced Raman scattering (SERS): from key parameters to good analytical practice. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **59**(14), 5454–5462.
47. Lin C., Li Y., Peng Y., Zhao S., Xu M., Zhang L., Huang Z., Shi J., Yang Y. (2023) Recent development of surface-enhanced Raman scattering for biosensing. *J. Nanobiotechnology.* **21**(1), 149.
48. Eilers P.H.C. (2003) A perfect smoother. *Anal. Chem.* **75**(14), 3631–3636.
49. Baek S.J., Park A., Ahn Y.J., Choo J. (2015) Baseline correction using asymmetrically reweighted penalized least squares smoothing. *Analyst.* **140**(1), 250–257.
50. Frens G. (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **241**(105), 20–22.
51. Hong S., Li X. (2013) Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions. *J. Nanomater.* **2013**(1), 790323.
52. Gerlier D., Thomasset N. (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods.* **94**(1–2), 57–63.
53. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**(1), 2006–2008.
54. Kumari G., Kandula J., Narayana C. (2015) How far can we probe by SERS? *J. Phys. Chem. C.* **119**(34), 20057–20064.
55. Xu W., Shi D., Chen K., Palmer J., Popovich D.G. (2023) An improved MTT colorimetric method for rapid viable bacteria counting. *J. Microbiol. Methods.* **214**, 106830.

Surface-Enhanced Raman Scattering to Improve the Sensitivity of the MTT-Test

B. A. Mushenkov^{1, *}, D. A. Lukyanov^{1, 2}, N. F. Meshcheryakova¹,
V. I. Kukushkin³, E. G. Zavyalova¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Center of Molecular and Cell Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

³Yu.A. Osipyan Institute of Solid State Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

*e-mail: vladimir.mushenkov@mail.ru

Currently, empirical therapy regimens are often used in the treatment of infectious diseases that are not based on data on pathogen resistance. One of the main reasons for the unjustified prescription of antibacterial drugs is the lack of rapid and at the same time universal methods of determining antibiotic resistance of the pathogen. The most widely used culture techniques, such as the microdilution method, require a long time to generate the necessary number of bacterial cells. Less time-consuming methods of resistance assessment (genomic or proteomic) are based on the determination of specific markers (resistance genes, overexpression of certain proteins, etc.); in this case, the specific protocol is most often applicable to a narrow number of both microorganism strains and antibiotics. Previously, we have demonstrated the possibility of using Raman spectroscopy (RS) technology for quantitative determination of the product of bacterial cell activity in the MTT assay, formazan, directly in the cell suspension. The absence of the formazan isolation step simplifies the assay and increases its accuracy. The analysis time did not exceed 2 h while maintaining the versatility of the MTT assay itself. Limitations of the developed protocol for RS detection of MTT assay results include a high sensitivity threshold of 10^7 CFU/mL for bacterial cell concentration, so a preliminary stage of cultivation is necessary for samples with low bacterial content. Here, we propose a method to increase the sensitivity of formazan determination by utilizing the effect of surface-enhanced Raman scattering (SERS) on gold nanoparticles. As a result of the study, the optimal conditions for SERS analysis of formazan in both solution and suspension of *Escherichia coli* cells are selected. Formazan signal amplification due to the use of SERS on gold nanoparticles instead of RS allowed us to reduce the sensitivity threshold for the number of bacterial cells in the sample at least 30 times, up to 3×10^5 CFU/mL. This sensitivity is not the limit of the SERS technology capabilities because of the introduction of other types of nanoparticles (more optimal in shape, size, concentration, etc.) into the experiment will allow to achieve even higher signal amplification.

Keywords: MTT assay, formazan, Raman scattering, surface-enhanced Raman scattering, *Escherichia coli*, bacteria, antibiotic resistance

УДК 577.2

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ НА ОСНОВЕ *in utero* ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ

© 2024 г. Ю. В. Попова^{a, b}, В. Д. Бец^c, Е. С. Омелина^a, Л. В. Болдырева^{a, d},
Е. Н. Кожевникова^{a, b, *}

^aИнститут молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090

^bНовосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, 630039

^cНовосибирский государственный технический университет, Новосибирск, 630073

^dНаучно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, 630117

*e-mail: kozhevnikova@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.04.2024 г.

После доработки 08.07.2024 г.

Принята к публикации 25.07.2024 г.

Для получения трансгенных лабораторных мышей требуется дорогостоящее оборудование и высококвалифицированный персонал, имеющий навыки проведения манипуляций с зиготами. Ранее в литературе был описан ряд высокоэффективных методов электропорации зигот для доставки систем геномного редактирования. Один из них – метод, названный *i-GONAD* (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery), который заключается в редактировании генома посредством доставки нуклеиновых кислот в зиготы за счет электропорации в яйцеводе *in utero*. В данной работе эта технология применена для разработки простого в использовании и экономически выгодного способа, позволяющего редактировать геном мышей с нуля с минимальными требованиями к навыкам оператора и наименьшим количеством используемых животных. Мы выбрали систему CRISPR/Cas9 в качестве инструмента редактирования генома и *i-GONAD* в качестве метода доставки генов для получения мутаций в гене *110* у мышей линии C57BL/6. Три животных (23%) из 13 родившихся детенышей имели генетические нарушения в локусе *110*, что указывает на применимость предложенного подхода. Данный протокол содержит подробное описание используемых методов в сочетании с рекомендациями по устранению ошибок и может представлять интерес для тех, кто стремится самостоятельно адаптировать технологию получения трансгенных мышей с нуля с минимальными затратами.

Ключевые слова: *i-GONAD*, редактирование генома, CRISPR/Cas9, *in utero*, мышь, трансгенная лаборатория

DOI: 10.31857/S0026898424060142, **EDN:** IAETMS

ВВЕДЕНИЕ

Редактирование генома животных включает несколько методологических особенностей, таких как анестезия/аналгезия, эмбриологические процедуры, подбор молекулярных инструментов и доставка нуклеиновых кислот. Каждый из этих аспектов предполагает выбор технических подходов, которые различаются от лабораторий к лабораториям в зависимости от предпочтений и навыков исследователей.

Развитие технологий точного редактирования генома повышает доступность получения трансгенных лабораторных животных. Для многих исследовательских групп освоение доступного метода модификации генов приведет к повышению качества научных работ в области

молекулярной биологии, генетики, персонализированной медицины и многих других направлений. Лаборатории и учреждения, имеющие многолетний опыт получения трансгенных животных, обычно следуют классическим методам трансгенеза и могут избегать технических усовершенствований. Напротив, вновь созданные команды ищут оптимальные способы выполнения редактирования генома для того, чтобы минимизировать затраты на оборудование, реагенты и время, затрачиваемое на освоение классической технологии, при этом оптимизируя количество используемых животных в соответствии с принципом 3R.

Микроинъекция в зиготы и перенос эмбрионов – наиболее трудоемкая и требующая навыков технология в редактировании генов

животных. Стоимость оборудования, необходимого для этого технического этапа, вносит наибольший вклад в общую стоимость выполнения трансгенеза. Помимо опыта и навыка микроинъекции в зиготы у оператора, требуются большие затраты на оборудование: высокотехнологичный микроскоп, микроманипуляторы, специализированные приборы для изготовления стеклянных микрокапилляров и оборудование для культивирования клеток. В последние годы электропорация эмбрионов вызывает повышенный интерес и значительно упростила доставку систем редактирования генов в зиготы, хотя она имеет существенные ограничения по сравнению с микроинъекцией. В 2015 г. Takahashi и соавт. опубликовали работу, посвященную методу редактирования генов лабораторных мышей с помощью электропорации зигот *in utero* на ранней стадии, а позже и для лабораторных крыс и хомяков [1–5]. Этот метод, названный i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery), сокращает время получения трансгенных животных за счет отсутствия шагов по сбору, культивированию и переносу эмбрионов псевдобеременным самкам, упрощая, таким образом, доставку генов и снижая стоимость трансгенеза [6–8]. Хотя до недавнего времени метод i-GONAD редко применялся другими научными группами, он представляется привлекательной альтернативой традиционной электропорации и переносу зигот при освоении технологии трансгенеза с нуля.

В этой работе мы преследовали две основные цели: (1) определить минимальный набор оборудования, реагентов и методов, необходимых для запуска технологии геномного редактирования на мышах; (2) оценить применимость метода i-GONAD и выявить его возможные недостатки при практическом использовании. Для работы использована линия мышей C57BL/6, несмотря на ее ограниченную пригодность для таких целей, поскольку мы стремились получить трансгенные линии на генетическом фоне C57BL/6 и избежать необходимости проведения возвратных скрещиваний трансгенного потомства. Система CRISPR/Cas9 (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9) использовалась в качестве инструмента редактирования генома для внесения генных мутаций. Представленный здесь метод подразумевает, что персонал имеет опыт обращения с мышами, навыки проведения анестезии/аналгезии, хирургических манипуляций, которые выполняются под контролем ветеринарного врача.

Наши данные свидетельствуют о том, что редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9 в сочетании с методом доставки i-GONAD подходит для получения нокаутных генов у мышей

C57BL/6 сотрудниками без навыков проведения манипуляций с зиготами. Описанный здесь подход может представлять собой самый простой и дешевый метод модификации генов мыши с нуля (рис. 1). Однако применение метода i-GONAD может сопровождаться высокой токсичностью для эмбрионов и смертностью новорожденных, что следует учитывать при его использовании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Эксперименты проводились в секторе экспериментальных животных Научно-исследовательского института нейронаук и медицины (НИИИМ, Новосибирск, Россия). Выживаемость зигот и эффективность электропорации оценивали с использованием аутбредной линии CD-1: самки (n = 20; возраст 8–14 недель) и самцы (n = 8; возраст 6–20 недель). Мы использовали самок мышей CD-1, поскольку для них характерно большее количество зигот по сравнению с самками линии C57BL/6. Исследование проводилось с использованием инбредной линии C57BL/6JNskrc (наша собственная субколлония C57BL/6J): самки (n = 40; возраст 8–14 недель) и самцы (n = 8; возраст 6–20 недель).

Взрослых самок содержали группами по 4–5 животных в клетке, взрослых самцов – индивидуально. Всех животных содержали в открытых клетках с фотопериодом 12 ч/12 ч свет/темнота (00:00–12:00–00:00) в стандартных условиях. Корм для грызунов (“Биопро”, Новосибирск, Россия) и воду давали вволю в соответствии с “5010” рационом грызунов (LabDiet, 13.1% ккал жиров, 58.2% ккал углеводов, 28.7% ккал белков) [9]. Клетки беременных самок не меняли в течение двух недель, начиная за 7 дней до родов. Беременным и кормящим самкам, помимо обычного корма, давали кормовые гранулы, богатые белками и жирами (сухой корм для взрослых собак мелких пород “Опти Баланс” с курицей, “Purina Pro Plan”, США).

Реагенты, оборудование. Все реагенты и оборудование подробно описаны в Дополнительных материалах в формате протокола (дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Popova_rus.zip).

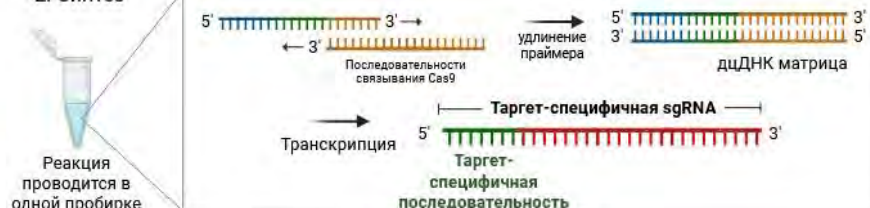
Электропоратор. В нашей работе мы используем электропоратор с прямоугольными импульсами (BEX CO LTD, кат. № CUY21EDIT2) в соответствии с [2]. Перед запуском устанавливаются следующие параметры: PdA – 100 mA; Pd on – 5.00 ms; Pd off – 50.00 ms; Pd cycle – 3; Pd V – 60 V; Decay – 10%; Decay Type: Log; mode – Square (mA) (+/-) в соответствии с [10]. Подробное описание режимов приведено в электронном приложении.

а синтез sgRNA

1. Дизайн таргет-специфичных праймеров



2. Синтез

**б i-GONAD**

1. Доставка комплекса RNP в ампулу яйцевода

**в Наложение швов и****послеоперационный уход**

1. Наложение вертикального узлового шва на разрезы в мышцах и на коже

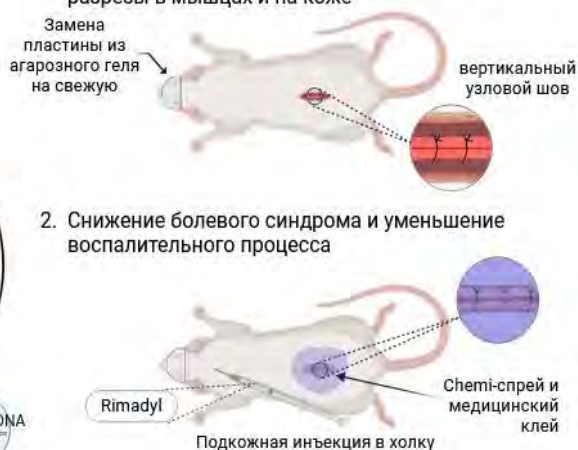


Рис. 1. Схема CRISPR/Cas9 редактирования генома в сочетании с методом i-GONAD. *а* – Синтез sgRNA (single guide RNA). *б* – Метод i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery). *в* – Наложение швов и послеоперационные процедуры. Рисунок создан на сайте biorender.com.

Программное обеспечение. Для анализа данных секвенирования ДНК по Сэнгеру (Geospiza Inc., США) использовали программу FinchTV. Веб-инструмент СНОРСНОР использовался для разработки целевых последовательностей направляющей РНК (gRNA, guide RNA) (chopchop.cbu.uib.no). Программное обеспечение STATISTICA12 использовалось для расчета статистической значимости.

Подготовка смеси для редактирования генома. Направляющие РНК (sgРНК, single guide RNA) для гена *И10* синтезированы с использованием олигонуклеотидов, разработанных с помощью EnGen sgRNA Synthesis Kit (“NEB”, кат. № E3322S) в соответствии с протоколом производителя (neb.com/en/protocols/2016/05/11/engen-sgrna-synthesis-kit-s-pyogenes-protocol-e3322). В результате для синтеза sgРНК использовали следующие праймеры: *И10_ex1_sg* (для экзона 1 гена *И10*) и *И10_ex2_sg* (для экзона 2 гена *И10*) (последовательности праймеров приведены в Дополнительных материалах). Синтезированные sgРНК очищали с использованием

набора Monarch RNA Cleanup Kit (“NEB”, кат. № T2040S) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию очищенных sgРНК определяли с помощью прибора NanoDrop.

Для приготовления раствора для редактирования генома 30 мкМ каждой sgРНК и 1 мг/мл белка Cas9-NLS (“NEB”, кат. № M0646T) разводили в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium (“ThermoFisher Scientific”, кат. № 31985062) и использовали в количестве 1,5 мкл/яйцевод для электропорации *in utero*.

Клонирование плазмид и тестирование sgРНК *in vitro*. Целевые локусы гена *И10* были клонированы в плазмидный вектор для проверки эффективности разработанных sgРНК *in vitro*. Наборы локус-специфичных праймеров *И10_ex1_gDNA_F/И10_ex1_gDNA_R* и *И10_ex2_F/И10_ex2_gDNA_R* (последовательности праймеров приведены в Дополнительных материалах) использовали для ПЦР-амплификации геномной ДНК в 25 мкл объеме реакции. Продукты ПЦР очищали с использованием набора для вы-

деления ДНК и РНК из агарозного геля (“Биолабмикс”, кат. № N-Gel-250) и лигировали в вектор pBlueScript SK (+) при +4°C в течение ночи с использованием ДНК-лигазы T4 (“Evrogen”, кат. № LK001). Вектор предварительно расщепляли при 37°C в течение 1 ч эндонуклеазой EcoRV (“SibEnzyme”, кат. № SE-E059). 1 мкл лигирующей смеси использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* TOP 10. Полученные плазмидные конструкции, содержащие фрагменты экзона 1 и экзона 2 гена *I110*, были проверены с помощью секвенирования по Сэнгеру. Плазмиды дополнительно линеаризовали эндонуклеазой ScaI (“New England Biolabs Inc.”, кат. № R3122) при 37°C в течение 1 ч перед использованием для расщепления Cas9. Реакции расщепления *in vitro* проводили в соотношении 20 : 120 : 1 (Cas9-NLS: sgРНК: линеаризованная ДНК-конструкция) в общем объеме 30 мкл при 37°C в течение 1 ч согласно инструкциям производителя (“NEB”, кат. № M0646). Каждую реакционную смесь смешивали с красителем и разделяли в 1%-ном агарозном геле, приготовленном на буфере TAE (Tris base/Acetic acid/EDTA).

Подготовка беременных самок мышей (гормональная стимуляция). Мы используем гормональную стимуляцию для суперовуляции у самок мышей линии C57BL/6, поскольку ранее было показано, что генетическая модификация в инбредных линиях мышей, представляющих интерес, таких как C57BL/6, по-прежнему является сложной задачей из-за их низкой фертильности и выживаемости эмбрионов [9]. Процедуру i-GONAD следует проводить на 0.7 день после оплодотворения (d.p.c., days post coitum) согласно [2]. Мы использовали следующий протокол, адаптированный к световому режиму нашего вивария (фотопериод 12 ч/12 ч свет/темнота, [00:00–12:00–00:00]). День 1 (11:00): внутрибрюшинно ввести PMSG (5 ME) (Prospec, кат. № HOR-272) в количестве 100 мкл/мышь. День 2 – пауза. День 3 (11:00): внутрибрюшинно ввести ХГЧ (5 ME) (Prospec, кат. № HOR-250) в количестве 100 мкл/мышь. После инъекции ХГЧ подсадить самок в клетку к самцу (1–2 самки к одному самцу). День 4 (10:00): проверить самок на наличие вагинальных пробок (признак успешного спаривания). Дальнейшие манипуляции с самками следует проводить, начиная с 12:30. По нашему опыту, самцы мышей спариваются с самками через несколько часов после подсадки в клетку, поэтому итоговое время спаривания составило примерно 0.7 d.p.c.

Для самок мышей линии CD-1 гормональная стимуляция не применялась, поскольку для них характерно большее количество зигот по сравнению с самками мышей линии C57BL/6. Для спаривания CD-1 самок помещают в клетку

к самцу (1–2 самки на одного самца). На следующий день (10:00) проверяют самок на наличие вагинальных пробок, дальнейшие манипуляции с самками производят, начиная с 12:30 (примерно 0.7 d.p.c.).

Эксперимент по электропорации *in utero* (i-GONAD). Пошаговая процедура редактирования генома CRISPR/Cas9 с инъекцией в яйцевод (анестезия и аналгезия, *in utero* инъекция и электропорация, хирургия и послеоперационный уход) подробно описана в Дополнительных материалах (см. http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Popova_rus.zip).

Тестирование процедуры электропорации на эмбрионах. Чтобы оценить ущерб от процедуры электропорации и потенциальную эмбриотоксичность конструкции к гену *I110*, мы оценили выживаемость зигот *in vitro*. Животных линии CD-1 подвергали электропорации *in utero* с использованием sgРНК к гену *I110* и Cas9 в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium (“ThermoFisher Scientific”, кат. № 31985062), а контрольных мышей линии CD1 подвергали электропорации с введенным раствором 1× PBS (вместо sgРНК и Cas9) в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Все манипуляции проводились на анестезированных беременных самках линии CD-1 (0.7 d.p.c.) без гормональной стимуляции. В обеих экспериментальных группах раствор вводили в ампулу яйцевода, а затем проводили процедуру электропорации (подробная процедура описана в Дополнительных материалах). Сразу после электропорации зиготы вымывали из ампулы с использованием среды EmbryoMax M2 Medium (“Sigma-Aldrich”, кат. № MR-015-D) с гиалуронидазой (“Roanal”, кат. № 08091, 10 мг/мл в среде M2). Затем зиготы помещали в среду KSOM Embryo Medium (“Sigma”, кат. № MR-101 D) на чашку Петри, покрытую минеральным маслом (“Sigma-Aldrich”, кат. № M8410–100ML). Далее зиготы инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 24 ч, после чего подсчитывали количество поделившихся клеток.

Для подтверждения эффективности процедуры электропорации в ампулу яйцевода вводили флуоресцентный краситель 4 кДа FITC-декстран (fluorescein isothiocyanate-dextran, “Sigma-Aldrich”, кат. № FD4 1G, 10 мкг/мкл, разведен в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium) в объеме 1.5 мкл/яйцевод с последующей электропорацией. Зиготы вымывали и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Генотипирование потомства. При отъеме потомства (возраст 4–5 недель) от матерей брали пробы ткани ушей, и эти образцы использовали для выделения геномной ДНК

и ПЦР-генотипирования. Подробная процедура подготовки ДНК описана в Дополнительных материалах. Вкратце, образцы ушей лизировали, и ДНК очищали с использованием фракционирования хлороформом и осаждения этанолом. Для генотипирования использовали пары праймеров *II10_ex1_gDNA_F/II10_ex1_gDNA_R* и *II10_ex2_F/II10_ex2_gDNA_R* (последовательности праймеров приведены в Дополнительных материалах). Образцы геномной ДНК амплифицировали с использованием BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (“Биолабмикс”, кат. № МНС010–200) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы ДНК интактных животных линии C57BL/6 использовали в качестве положительного контроля, а *mQ H₂O* – в качестве отрицательного. Образцы ПЦР далее анализировали в 2% агарозном геле в 0.5 × буфере TBE (Tris/Borate/EDTA) и выделяли из геля с использованием набора для выделения ДНК и РНК из агарозного геля (“Биолабмикс”, кат. № N-Gel-250). Полученные образцы ДНК использовали для секвенирования по Сэнгеру с использованием набора для циклического секвенирования BigDye Terminator v3.1 (“ThermoScientific”, кат. № 4337455).

Для точной идентификации геномных модификаций продукты ПЦР обрабатывали полимеразой Pfu (“SibEnzyme”, кат. № B310) при 37°C в течение 30 мин для получения тупых концов, далее очищали из геля с использованием набора для выделения ДНК и РНК из агарозного геля (“Биолабмикс”, кат. № N-Gel-250) и лигировали в вектор pBlueScript SK (+) при +4°C в течение ночи с использованием ДНК-лигазы T4 (“Evrogen”, кат. № LK001). Вектор предварительно расщепляли при 37°C в течение 1 ч эндонуклеазой EcoRV (“SibEnzyme”, кат. № SE-E059). 1 мкл лигирующей смеси использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* TOP 10. Полученные конструкции, содержащие фрагменты экзона 1 и экзона 2 гена *II10*, были проверены с помощью секвенирования по Сэнгеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ эффективности sgРНК/Cas9 in vitro

Для оценки эффективности синтезированных sgРНК проведен анализ гидролиза нуклеазой Cas9 *in vitro*. Плазмиды, содержащие локусы-мишени гена *II10*, расщеплялись эндонуклеазой ScaI, что линеаризовало векторы. После этого рибонуклеарный (RNP, ribonuclear) комплекс Cas9 расщепил векторы, в результате чего образовались два линейных фрагмента. Мы предполагаем, что эффективность ScaI близка к 100%, таким обра-

зом, негидролизованные фрагменты возникают в результате неполного расщепления комплексом RNP. Эффективность расщепления была выше для экзона 1, нацеленного на *II10_ex1_sg*, по сравнению с экзоном 2, нацеленным на *II10_ex2_sg*. Мы использовали обе sgРНК в одной смеси RNP для дальнейших процедур (рис. 2а).

Выживаемость эмбрионов после электропорации

В первую очередь было проверено влияние электропорации на развитие зигот. Для этого беременным самкам CD-1 (0.7 d.p.c.) с вагинальными пробками провели процедуры введения в ампулу яйцевода раствора, состоящего из физиологического раствора и красителя (0.4% трипановый синий), с последующей электропорацией. У контрольной группы самок данные манипуляции не проводились. После этого была проведена процедура вымывания зигот из ампулы в среду EmbryoMax Advanced KSOM Embryo Medium (“Sigma”, кат. № MR-101-D) и перенос в 6-луночный планшет для культивирования. Далее зиготы инкубировали при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч, после чего подсчитывали количество двухклеточных эмбрионов. Показано, что в контрольной группе (без электропорации) из примерно 100 живых зигот количество двухклеточных эмбрионов составляло 25–30%. В экспериментальных группах (введение раствора и электропорация или только введение раствора) процент делящихся клеток был сопоставим с контролем. Таким образом, показано, что введение раствора и электропорация не влияют на процесс деления зиготы, но сама электропорация приводила к гибели зигот примерно в 70% случаев (рис. 2б).

Затем мы проверили потенциальный токсичный эффект синтезированной нами sgРНК. Мы электропорировали яйцеводы беременных самок CD-1 (0.7 d.p.c.), в которые предварительно были введены растворы с обеими sgРНК в одной смеси RNP в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium либо PBS (контрольная группа), вымыли эмбрионы из ампулы яйцевода и оставили их в условиях клеточной культуры на ночь в EmbryoMax Advanced KSOM Embryo Medium. На следующий день мы обнаружили, что из примерно 100 живых зигот 22.76% делились в контрольной группе и 28.74% – в группе RNP, что указывает на то, что комплексы RNP не оказывали дополнительного токсического воздействия на эмбрионы (рис. 2б).

Далее с использованием FITC-декстрана в качестве флуоресцентного маркера-заместителя нуклеиновых кислот протестировали, подходят ли условия электропорации, опубликованные ранее, для доставки генов к эмбрионам [10].

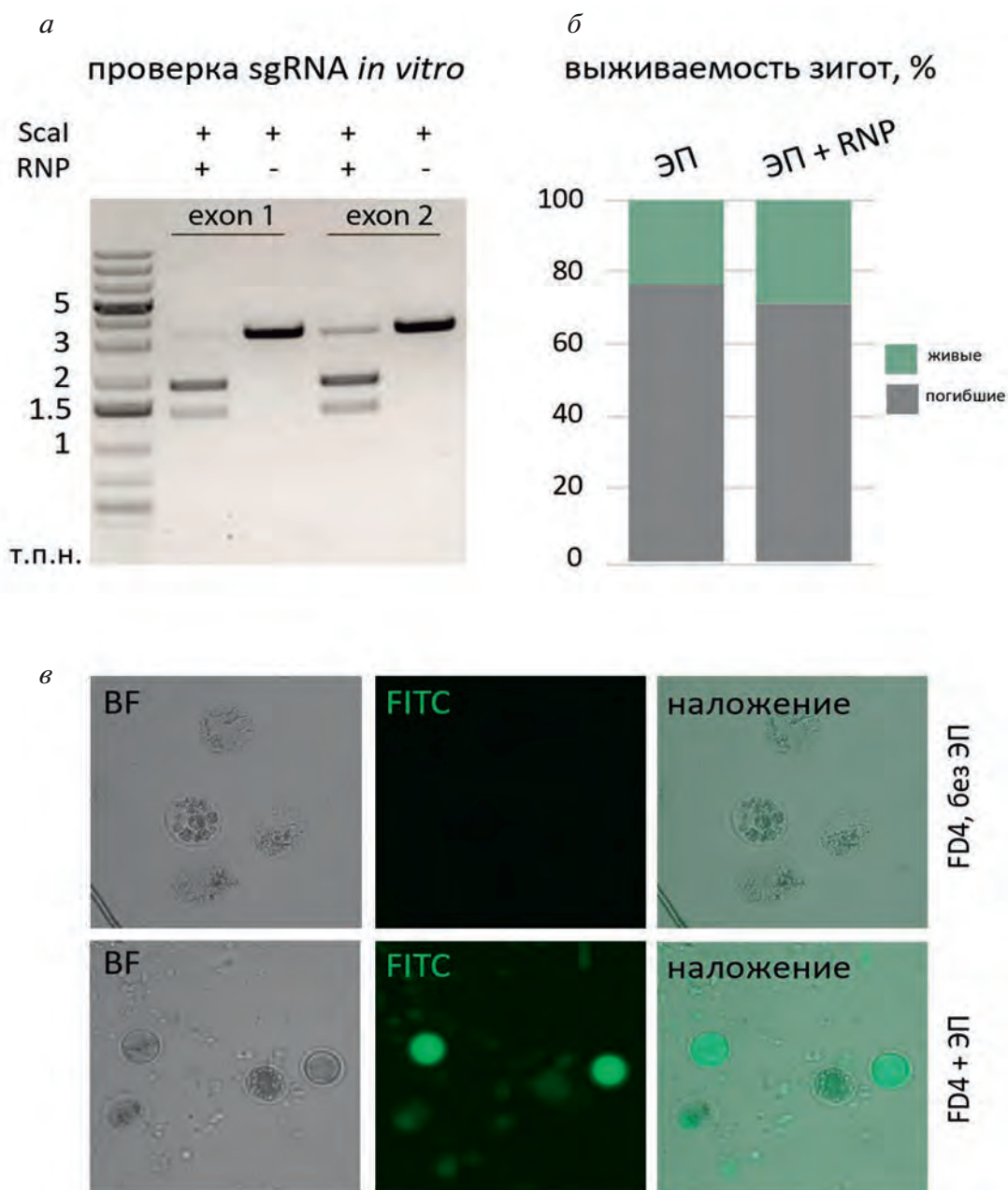


Рис. 2. Адаптация и тестирование метода *i-GONAD*. *а* – Тестирование sgPHK *in vitro*. Электрофорез в агарозном геле ScaI-линеаризованного вектора pBlueScript SK (+), несущего фрагмент геномной области экзона 1 или экзона 2 гена *Il10*. RNP – рибонуклеарные комплексы sgPHK и белка Cas9. *б* – Выживаемость зигот *in vitro* после электропорации *in utero*. ЭП – электропорация. *в* – Тест на эффективность электропорации *in utero* с использованием 4кДа FITC-декстран (FD4).

Как видно из рис. 2, электропорация приводила к накоплению сигнала FITC примерно у 40% электропорированных зигот, тогда как в контроле без электропорации сигнал не наблюдался (рис. 2в). Этот результат согласуется с ранее опубликованными данными о том, что доставка генов посредством электропорации внутриутробно не эффективна на 100% [11, 12].

Редактирование генома с использованием метода *i-GONAD*

Смесями RNP к гену *Il10* нами были электропорированы зиготы мышей C57BL/6 *in utero*. Всего в 7 опытах использовано 40 самок в возрасте 8–14 недель и 8 самцов возрастом 6–20 недель, с половым опытом. Для всех са-

Таблица 1. Количество рожденных и выживших детенышей и эффективность трансгенеза

Эксперимент, номер	Количество использованных самок	Родившие самки	Количество родившихся детенышей	Выжившие детеныши	Детеныши с нарушениями в области гена P110
1	5	0	0	0	
2	5	0	0	0	
3	5	1	3	3	
4	5	3	22	0	
5	10	5	26	7	2 (в экзоне 2)
6	7	2	4	0	
7	3	1	3	3	1 (в экзоне 1)
Всего	40	12 (30%)	58	13 (22.4%)	3 (23% от выживших детенышей)

мок C57BL/6 выполнена процедура гормональной суперовуляции перед спариванием. Из 40 самок только 12 особей (30%) дали потомство, что отражает высокий уровень смертности эмбрионов после электропорации, как мы наблюдали в приведенном выше тестировании *in vitro*. Самки родили 58 детенышей, из которых выжили только 13 (22.4%), а прочие погибли в результате каннибализма со стороны матерей (табл. 1).

Из выживших 13 детенышей у 3 (23%) была нарушена область гена P110, соответствующая сайту связывания sgPНК и ниже него. У одного детеныша (#58) отмечены нарушения в экзоне 1 гена P110, а у двух других (#27 и #32) обнаружены нарушения в экзоне 2 (рис. 3), однако геномных делеций между экзоном 1 и экзоном 2 не произошло.

Решение проблем

В первом эксперименте процедура i-GONAD проведена согласно [2], но вместо изофлурановой анестезии использовали схему анестезии “Домитор + Золетил” (“Orion Pharma”, Финляндия; “Virbac”, Франция), подробно приведенную в методах (см. Дополнительные протоколы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Popova_rus.zip). Однако в пилотном эксперименте не удалось получить беременных самок. Мы не связываем эту неудачу с анестезией, поскольку она успешно использовалась многими научными группами [13–15]. По результатам первого эксперимента был отмечен ряд проблем: 1) шерсть мыши попадала в рану; 2) прооперированные мыши быстро снимали швы; 3) роговица глаз мышей высыхает во время операции, несмотря на использование крема для глаз, как предложено в опубликованных протоколах.

Таким образом, ко второму эксперименту, были оптимизированы следующие процедуры.

1. Сбривалась шерсть на месте проведения операции, чтобы избежать ее попадания в рану как при разрезе кожи, так и при наложении швов. Отмечено, что сбривание шерсти вокруг места разреза положительно влияет на заживление ран.

2. Для снижения риска снятия швов мышам в первые часы после операции для защиты шва наносили медицинский клей “БФ-6” (“Вертекс”, Россия). Для улучшения заживления ран использовали “Chemi” спрей – противовоспалительный и антибактериальный препарат (“Industrial Veterinaria S.A. Invesa”, Испания). Поскольку мыши могут снимать швы из-за болевого синдрома, для уменьшения боли мы использовали обезболивающий и противовоспалительный препарат “Rimadyl” (“Zoetis”, Бразилия).

3. Для снижения риска высыхания роговицы глаза во время операции и наркоза использовали пластины из агарозного геля, чтобы защитить глаза животных от повреждений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Собственное производство трансгенных животных может быть полезным для научных групп, специализирующихся на генетике и физиологии животных, а также для тех, кто стремится получить уникальные линии, например персонализированные модели животных. Однако это возможно только в том случае, если технология редактирования генома будет достаточно простой, чтобы ее можно было внедрить в повседневную жизнь лаборатории, работающей на животных. Кроме того, доступный трансгенез мышей не должен требовать длинного списка дополнительного дорогостоящего оборудования и соответствовать бюджету лаборатории.

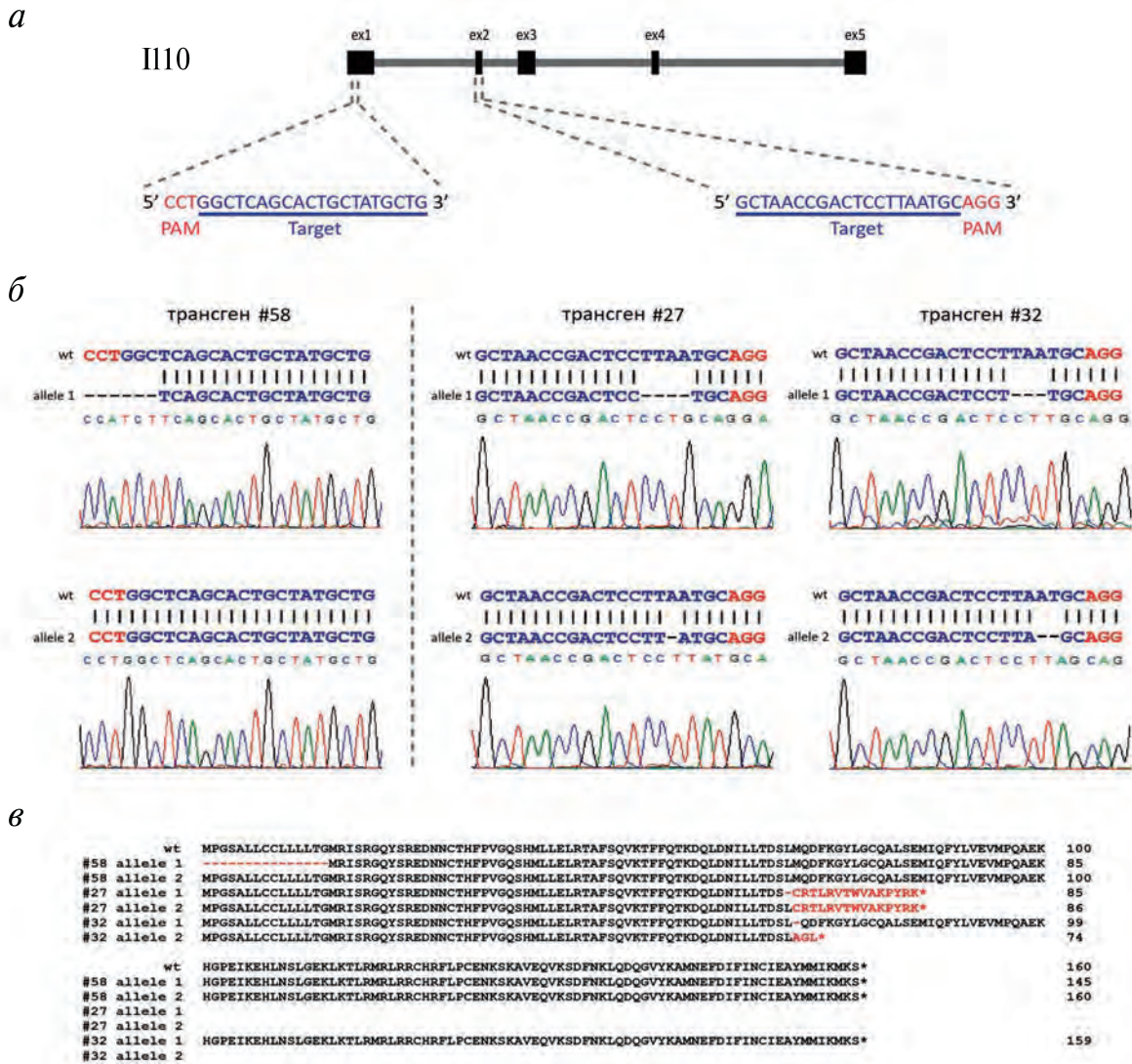


Рис. 3. Генотипирование потомства. *а* – Схематическая иллюстрация локуса *III0* дикого типа. Экзоны (от ex1 до ex5) и интроны обозначены черными прямоугольниками и серой линией соответственно. Две целевые последовательности (ex1 и ex2) подчеркнуты и показаны синим цветом. Последовательности мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), показаны красным. – Прямое секвенирование по Сэнгеру геномных регионов гена *III0* в потомстве F1. Трансен #58 имеет нарушения в экзоне 1, два других (#27 и #32) – в экзоне 2 гена *III0*. *б* – Сравнение аминокислотных последовательностей гена *III0* дикого типа и потомства после i-GONAD. Контрольная аминокислотная последовательность белка *III0* дикого типа показана сверху. Аминокислотные последовательности мутированных белков *III0* (полученных из трансгенов #58, #27 и #32) показаны ниже. Прогнозируемые последствия мутации аминокислотных последовательностей выделены красным. Стоп-кодоны обозначены *.

Технология CRISPR/Cas9 значительно упростила производство трансгенных животных, поскольку повысила точность редактирования генов и устранила необходимость в эмбриональных стволовых клетках [16]. В то же время в основе трансгенеза лежит трудоемкий этап введения молекулярных смесей в пронуклеус, требующий высокой квалификации сотрудников и дорогостоящего оборудования. В настоящий момент этот метод доставки ак-

тивно заменяется электропорацией зигот, что существенно упрощает метод трансгенеза [17]. Тем не менее, этот подход по-прежнему требует эвтаназии самок-доноров зигот, требует дополнительной группы вазэктомированных самцов для получения псевдобеременных самок-реципиентов и требует культивирования эмбрионов *in vitro*. Эти аспекты приводят к дополнительным затратам и усилиям, кото-

рые ограничивают широкое распространение редактирования генома мыши.

Используемый здесь метод i-GONAD преодолевает вышеуказанные ограничения и делает трансгенез доступным практически для любой лаборатории, которая уже работает с мышами. Эффективность этого метода доказана на нескольких видах животных и различных линиях мышей [1–4]. На наш взгляд, некоторые стандартные опубликованные параметры электропорации оказались токсичными для эмбрионов [2]. Imai и его коллеги предлагают использовать 3 импульса переноса вместо 6, предложенных первоначально, для увеличения выживаемости эмбрионов у разных линий мышей, однако этот подход не был адаптирован для модификации генома мышей наиболее востребованной линии C57BL/6 [18].

Высокий уровень каннибализма самок по отношению к новорожденным детенышам — еще одна техническая проблема, с которой мы столкнулись в этом исследовании. Каннибализм распространен среди широко используемых инбредных штаммов, таких как C57BL/6 и BALB/c (около 32%), тогда как для некоторых генетически модифицированных штаммов этот риск еще выше (50%) [19, 20]. В нашей виварии самки демонстрируют схожий уровень каннибализма (около 30%). В i-GONAD экспериментах мы наблюдали необычно высокий уровень каннибализма среди подопытных самок, так что около 75% детенышей не выжили в первые дни жизни, что согласуется с опубликованными ранее данными [20]. Пока готовилась к публикации эта работа, Melo-Silva и соавт. опубликовали свои результаты по адаптации метода i-GONAD для линии C57BL/6, где они описывают аналогичные проблемы [9]. Авторы предлагают совместное содержание синхронизированных беременных мышей C57BL/6 с беременными самками-компаньонами линии FVB/NJ, чтобы последние способствовали выживанию детенышей [9]. Это может стать отличным дополнением к представленному здесь описанию метода, поскольку может значительно повысить эффективность i-GONAD.

Важно отметить, что между двумя сайтами-мишенями для Cas9 (экзон 1 и экзон 2 гена *Il10*) геномных делеций не произошло несмотря на то, что были использованы обе sgРНК одновременно. Это предполагает низкую частоту двуцепочечных разрывов после расщепления Cas9. Факторы доступности ДНК, а также несовершенный дизайн sgРНК могут быть причиной того, что мы не наблюдали двуцепочечных разрывов и геномных делеций. Также важно учитывать факторы, которые максимизируют расщепление желаемой целевой последователь-

ности или целевой активности. Например, sgРНК с нуклеотидом G на 1 п.н. выше РАМ могут быть более эффективными, чем sgРНК с C в том же положении, даже если оба они идеально соответствуют целевой последовательности. Таким образом, улучшение выбора sgРНК может повысить эффективность и удобство использования описанных параметров.

В целом, предложенный здесь подход может обеспечить эффективный и относительно простой старт для лаборатории, у которой не было предыдущего опыта проведения эмбриологических процедур на мышах или опыта получения трансгенных животных.

Мы благодарим организаторов и докладчиков практического курса EMBO 2019 по геномной инженерии мышей, проводимого в Институте молекулярно-клеточной биологии и генетики Макса Планка (Дрезден, Германия), за то, что они поделились своим опытом в области электропорации зигот и редактирования генома мышей.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-26-20045).

Все процедуры проводились в соответствии с российским законодательством и со стандартами надлежащей лабораторной практики (директива Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.), рекомендациями биоэтического комитета и Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Все процедуры одобрены Биоэтическим комитетом НИИМ, протокол № 5 от 16.02.2023 г. Все результаты публикуются в соответствии с рекомендациями ARRIVE [21].

Авторы подтверждают, что не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi G., Gurumurthy C.B., Wada K., Miura H., Sato M., Ohtsuka M. (2015) GONAD: Genome-editing via oviductal nucleic acids delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci. Rep.* **5**, 11406. <https://doi.org/10.1038/srep11406>
2. Ohtsuka M., Sato M., Miura H., Takabayashi S., Matsuyama M., Koyano T., Arifin N., Nakamura S., Wada K., Gurumurthy C.B. (2018) I-GONAD: A robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.* **19**, 25. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1400-x>
3. Sato M., Nakamura S., Inada E., Takabayashi S. (2022) Recent advances in the production of genome-edited rats. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(5), 2548. <https://doi.org/10.3390/ijms23052548>

4. Hirose M., Tomishima T., Ogura A. (2023) Editing the genome of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Meth. Mol. Biol.* **2637**, 247–254. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3016-7_19
5. Namba M., Kobayashi T., Koyano T., Kohno M., Ohtsuka M., Matsuyama M. (2021) GONAD: A new method for germline genome editing in mice and rats. *Dev. Growth. Differ.* **63**(8), 439–447. <https://doi.org/10.1111/dgd.12746>
6. Kobayashi Y., Aoshima T., Ito R., Shinmura R., Ohtsuka M., Akasaka E., Sato M., Takabayashi S. (2020) Modification of i-GONAD suitable for production of genome-edited C57BL/6 inbred mouse strain. *Cells.* **9**(4), 957. <https://doi.org/10.3390/cells9040957>
7. Shang R., Zhang H., Bi P. (2021) Generation of mouse conditional knockout alleles in one step using the i-GONAD method. *Gen. Res.* **31**(1), 121–130. <https://doi.org/10.1101/gr.265439.120>
8. Sato M., Nakamura A., Sekiguchi M., Matsuwaki T., Miura H., Gurumurthy C.B., Kakuta S., Ohtsuka M. (2023) Improved genome editing via oviductal nucleic acids delivery (i-GONAD): Protocol steps and additional notes. *Meth. Mol. Biol.* **2631**, 325–340. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2990-1_14
9. Melo-Silva C.R., Knudson C.J., Tang L., Kafle S., Springer L.E., Choi J., Snyder C.M., Wang Y., Kim S.V., Sigal L.J. (2023) Multiple and consecutive genome editing using i-GONAD and breeding enrichment facilitates the production of genetically modified mice. *Cells.* **12**(9), 1343. <https://doi.org/10.3390/cells12091343>
10. Gurumurthy C.B., Sato M., Nakamura A., Inui M., Kawano N., Islam M.A., Ogiwara S., Takabayashi S., Matsuyama M., Nakagawa S., Miura H., Ohtsuka M. (2019) Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD. *Nat. Protoc.* **14**(8), 2452–2482. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0187-x>
11. Garcia-Frigola C., Carreres M.I., Vegar C., Herrera E. (2007) Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. *BMC Dev. Biol.* **7**, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-103>
12. Shinmyo Y., Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A., Kawasaki H. (2016) CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation. *Sci. Rep.* **6**, 20611. <https://doi.org/10.1038/srep20611>
13. Book Reviews. (2002) *J. Vet. Med. Educ.* **29**, 245–246. <https://doi.org/10.3138/jvme.29.4.245>
14. Cagle L.A., Franzi L.M., Epstein S.E., Kass P.H., Last J.A., Kenyon N.J. (2017) Injectable anesthesia for mice: combined effects of dexmedetomidine, tiletamine-zolazepam, and butorphanol. *Anesthesiol. Res. Pract.* **2017**, 9161040. <https://doi.org/10.1155/2017/9161040>
15. Limprasutr V., Sharp P., Jampachaisri K., Pacharinsak C., Durongphongtorn S. (2021) Tiletamine/zolazepam and dexmedetomidine with tramadol provide effective general anesthesia in rats. *Animal Model Exp. Med.* **4**(1), 40–46. <https://doi.org/10.1002/ame2.12143>
16. Cohen J. (2016) “Any idiot can do it.” Genome editor CRISPR could put mutant mice in everyone’s reach. *Science.* <https://doi.org/10.1126/science.aal0334>
17. Modzelewski A.J., Chen S., Willis B.J., Lloyd K.C.K., Wood J.A., He L. (2018) Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nat. Protoc.* **13**(6), 1253–1274. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.012>
18. Imai Y., Tanave A., Matsuyama M., Koide T. (2022) Efficient genome editing in wild strains of mice using the i-GONAD method. *Sci. Rep.* **12**(1), 13821. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17776-x>
19. Weber E.M., Algers B., Würbel H., Hultgren J., Olsson I.A.S. (2013) Influence of strain and parity on the risk of litter loss in laboratory mice. *Reprod. Domest Anim.* **48**(2), 292–296. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02147.x>
20. Carter D.B., Kennett M.J., Franklin C.L. (2002) Use of perphenazine to control cannibalism in DBA/1 mice. *Comp. Med.* **52**(5), 452–455.
21. Du Sert N.P., Hurst V., Ahluwalia A., Alam S., Avey M.T., Baker M., Browne W.J., Clark A., Cuthill I.C., Dirnagl U., Emerson M., Garner P., Holgate S.T., Howells D.W., Karp N.A., Lázic S.E., Lidster K., MacCallum C.J., Macleod M., Pearl E.J., Petersen O.H., Rawle F., Reynolds P., Rooney K., Sena E.S., Silberberg S.D., Steckler T., Würbel H. (2020) The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **18**(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

Adapting Mouse Genome Editing Technique from Scratch Using *in utero* Electroporation

J. V. Popova^{1,2}, V. D. Bets³, E. S. Omelina¹, L. V. Boldyreva^{1,4}, E. N. Kozhevnikova^{1, 2, *}

¹*Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, 630039 Russia*

³*Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, 630073 Russia*

⁴*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, 630117 Russia*

*e-mail: kozhevnikova@mcb.nsc.ru

Mouse genome modification requires costly equipment and highly skilled personnel to manipulate zygotes. A number of zygote electroporation techniques were reported to be highly efficient in gene delivery. One of these methods called i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) describes electroporation-based gene transfer to zygotes *in utero*. Here we adopted this technology to develop an easy-to-use and cost-effective pipeline enabling mouse genome-editing from scratch with minimal requirements to operator skills and animal use. We chose the CRISPR/Cas9 system as a genome editing tool and i-GONAD as a gene delivery method to produce *Il10* knockout in C57BL/6 mice. Three animals out of 13 delivered pups (23%) were genetically compromised at *Il10* locus suggesting the feasibility of the approach. This protocol provides detailed description of the used technical settings paired with troubleshooting tips and could be of interest to those who aim at establishing in-house mouse transgenesis pipeline at minimal equipment cost from scratch.

Keywords: i-GONAD, genome editing, CRISPR/Cas9, *in utero*, mouse, transgenic laboratory

АНТИГЛИКИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОИНДОЛА И ЕЕ ПРЕДСКАЗАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНЕРГИЙ ГРАНИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОРБИТАЛЕЙ

© 2024 г. У. М. Ибрагимова^a, Н. В. Валуйский^a, С. А. Сорокина^a,
К. И. Жукова^a, В. Р. Райберг^a, Р. А. Литвинов^{a, b, *}

^aВолгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, 400066

^bВолгоградский медицинский научный центр, Волгоград, 400066

*e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2024 г.

После доработки 18.06.2024 г.

Принята к публикации 21.06.2024 г.

Внеклеточный матрикс обеспечивает механическую поддержку клеток и участвует в регуляции клеточной активности. Нарушение функций внеклеточного матрикса при метаболических отклонениях или старении может приводить к развитию заболеваний. Разработка протекторов внеклеточного матрикса актуальна для этиотропной профилактики и лечения патологий, связанных с изменением внеклеточного матрикса. Ключевыми механизмами формирования патологических изменений во внеклеточном матриксе являются неэнзиматические реакции, такие как гликирование и гликоксидация. Перспективность потенциальных протекторов внеклеточного матрикса можно оценить по их способности ингибировать гликирование и гликоксидацию. Изучена способность соединений на основе гетероциклических скаффолдов, содержащих частично гидрированный изоиндолный фрагмент, замедлять образование конечных продуктов гликирования. Исследование проведено методами *in silico* и *in vitro*. В ходе исследования *in silico* с применением метода *ab initio* с базисным набором функций 6-311G(d, p) мы определили энергии граничных молекулярных орбиталей соединений. Затем оценили их антигликирующую активность в реакции гликирования бычьего сывороточного альбумина глюкозой (альбумин рассматривали в качестве модельного белка). В качестве соединения сравнения использовали пиридоксамин. Антигликирующую активность соединений оценивали спектрофлуориметрически путем измерения флуоресцирующих продуктов при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм (обычно не используемых для оценки антигликирующих свойств). Использование этих длин волн позволяет выявлять продукты гликирования и окисления в коже человека, количество которых, в отличие от некоторых других продуктов гликирования, коррелирует с календарным возрастом. Экспериментально установлено, что значения энергий граничных молекулярных орбиталей могут служить предикторами способности соединений замедлять образование флуоресцирующих продуктов, определяемых при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм. Ингибирование образования указанных флуоресцирующих продуктов может иметь значение для лечения и профилактики заболеваний, в том числе метаболических, фиброзирующих или возрастных. Установлено также, что антигликирующие свойства наиболее выражены в ряду гидрированных 3а,6-эпоксиизоиндола-7-карбоновых кислот (соединения типа **XIII**) и циклопента[*b*]фура[2,3-*c*]пиррола-3-карбоновых кислот (структуры типа **XIX**), взятых в концентрации 100 мкМ.

Ключевые слова: гликирование, гликоксидация, внеклеточный матрикс, альбумин, циклопента[*b*]фура[2,3-*c*]пиррол, 3а,6-эпоксиизоиндол

DOI: 10.31857/S0026898424060153, EDN: IACGIA

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточный матрикс выполняет множество функций, включая каркасную (поддержка клеток), регуляторную (регуляция пролиферативной и секреторной активности, влияние на дифференцировку, миграцию и апоптоз), барьерную и др. [1–3]. Нарушение организации внеклеточного матрикса способно негативно влиять на со-

стояние находящихся в нем клеток, что на уровне организма проявляется развитием патологий и наблюдается при наследственных заболеваниях (например, при синдроме Марфана), метаболических патологиях (сахарный диабет), в ходе старения и при фиброзирующих болезнях [4–8]. Повреждение внеклеточного матрикса может быть приобретенным, сформированным в результате

неэнзиматических посттрансляционных модификаций его белков. К важным повреждающим механизмам относятся гликирование, гликоксидация и др. [7, 9]. Реакция гликирования стимулирует окислительный стресс, усиление воспаления. Образование конечных продуктов гликирования (КПГ) во внеклеточном матриксе влияет на его структурные и механические свойства, а сами КПГ относятся к молекулярным паттернам, ассоциированным с повреждением (DAMP) [10–12].

Соединения, способные ингибировать гликирование и образование КПГ, могут рассматриваться в качестве этиотропных средств профилактики/лечения некоторых заболеваний, связанных с повреждением внеклеточного матрикса, в том числе фиброзирующих, поздних осложнений сахарного диабета, воспалительных заболеваний и др. Альбумины, особенно бычий сывороточный альбумин (БСА), часто служат модельными белками в различных исследованиях, включая фармакологические [13, 14]. Благодаря универсальной природе гликирования, а также высокой степени изученности и хорошей водорастворимости, альбумины могут использоваться в качестве модельных белков при разработке антигликаторов, служащих протекторами внеклеточного матрикса.

Индол и изоиндол рассматриваются в качестве основы для поиска и направленного конструирования протекторов внеклеточного матрикса. Производные индола и изоиндола обладают антиоксидантными [15], антигликирующими свойствами [16]. Кроме того, производные индола способны снижать вызванную КПГ активацию циклооксигеназы-2 (COX-2) и продукцию простагландина E_2 (PGE_2), благодаря подавлению связи КПГ-АФК-NF- κ B [16]. Результаты настоящего исследования дают представление о способности производных изоиндола ингибировать образование продуктов, флуоресцирующих на длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм, возникающих в реакции глюкозы с БСА. Это позволяет оценить перспективы применения соединений в качестве средств защиты внеклеточного матрикса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Скаффолды с фрагментом изоиндола и других азотистых гетероциклов синтезированы по известным методикам [17–25]. Морфолины, пиперидины и гидрированные изоиндолы I–VI получены согласно [17–20]. 5-Метилизоиндоло[2,1-*a*]хинолин-5-оны VII–X синтезированы по [21–23]. 3-Аллил-1-оксо-1,2,3,6,7,7а-гексагидро-3а,6-эпоксиизоиндол-7-карбоновые кислоты XI–XVI получены согласно [24, 25]. Эфиры 4-оксо-2-винил-3,3а,4,5,5а,6-гексагидро-2*H*-циклопента[b]

фуоро[2,3-*c*]пиррол-3-карбоновых кислот XVII–XIX получены по методикам, описанным в [26].

Ряд субстанций IV, V, XI–XVI использовали в виде диастереомерных смесей с соотношением пространственных изомеров, близким к 50/50.

Субстанции IV–XIX для проведения биологического скрининга очищали путем кристаллизации из смесей гексан/этилацетат или *i*PrOH/DMF. Гетероциклы I–III очищали фракционированием при пониженном давлении. Строение и индивидуальность образцов контролировали, сравнивая экспериментальные ^1H и ^{13}C ЯМР-спектры с опубликованными данными [17–26].

Расчет энергий молекулярных орбиталей. Построение оптимальных 3D-моделей исследуемых соединений выполняли в несколько этапов. На предварительном этапе – путем минимизации энергии через вращение торсионно-подвижных связей с использованием программного обеспечения Chem3D (Dihedral Driver). Затем геометрию молекул последовательно оптимизировали с использованием метода молекулярной механики MM⁺, полуэмпирического метода PM3, метода *ab initio* с базисным набором функций 6-31G(d, p) с помощью программного обеспечения HyperChem. Энергии граничных α и β молекулярных орбиталей (E_{HOMO} и E_{LUMO}) оптимизированных конформаций вычисляли методом *ab initio* с базисным набором функций 6-311G(d, p). Используя результаты расчета, определяли разницу в значениях энергий E_{HOMO} и E_{LUMO} . Энергетическая щель $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ представляет собой классический параметр в квантово-химических расчетах и обычно обозначает наименьшее возможное электронное возбуждение в молекуле.

Оценка антигликирующей активности. Согласно механистическому взгляду на гликирование/гликоксидацию, пути реакции, зависимые от процессов окисления (окислительный распад продуктов Амандори, образование некоторых карбонильных соединений), тесно сопряжены с процессами, способными протекать в отсутствие окисления [27]. В настоящей работе для упрощения все события, приводящие к образованию флуоресцирующих конечных продуктов взаимодействия глюкозы и альбумина, объединены термином “реакция гликирования”. Соответственно, сами продукты обозначены как “конечные продукты гликирования”.

Реакция гликирования проведена в фосфатном буферном растворе pH 7.4. Состав реакционной среды: 0.36 М глюкоза и 1 мг/мл БСА (фракция V). Объем реакционной среды в каждой пробе составлял 900 мкл. Исследуемые соединения растворяли в 99%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО)

и вносили в реакционную среду в объеме, равном 30 мкл (конечная концентрация ДМСО в реакционной среде ~3%). Определяли активность соединений в концентрации 100 мкМ. Контрольные пробы содержали эквивалентный объем растворителя без соединений. В качестве соединения сравнения использовали пиридоксамин. Образцы инкубировали в течение 24 ч при 60°C.

Конечные продукты реакции определяли спектрофлуориметрически при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм (спектрофлуориметр M 200 PRO, "TECAN", Австрия). Учитывая, что при использованных нами длинах волн возбуждения/испускания удастся зарегистрировать конечные продукты "гликирования и окисления" [28], накапливающиеся в коже с возрастом, нельзя исключать их образования и в ходе реакции гликирования *in vitro*. Эти продукты, хотя они и не охарактеризованы, обоснованно рассматриваются как связанные с реакциями гликирования и окисления, что с определенным допущением позволяет моделировать процессы, характерные для старения.

С целью исключения ложноположительных результатов для соединений, подавляющих флуоресценцию образующихся КППГ за счет интерференции, проводили логарифмическое нормирование получаемых значений по формуле 1:

$$\text{Flu}(\lg) = 10^{(\lg(\text{Exp}) - \lg(\text{Blank}))} - 1, \quad (1)$$

где Flu(lg) – нормированная интенсивность флуоресценции КППГ, lg(Exp) и lg(Blank) – десятичные логарифмы фактических уровней флуоресценции гликированных и соответствующих им негликированных проб.

Нормирование значений, получаемых для прочих соединений (не способных к интерференции или умеренно флуоресцирующих при используемых длинах волн возбуждения/испускания), проводили по формуле 2:

$$\text{Flu}(\text{lin}) = \text{Exp} - \text{Blank}, \quad (2)$$

где Flu(lin) – нормированная интенсивность флуоресценции КППГ, Exp и Blank – фактические уровни флуоресценции гликированных и соответствующих им негликированных проб.

Активность соединений, выраженную как % снижения флуоресценции КППГ в опытных пробах в сравнении с контролем, определяли по формуле 3:

$$\% = 100 - (\text{Flu}(\text{Exp}) \times 100 / \text{Flu}(\text{Contr})), \quad (3)$$

где Flu(Exp) и Flu(Contr) – предварительно нормированные интенсивности флуоресценций КППГ опытных и контрольных проб соответственно.

Статистическую значимость различий опытных и контрольных проб оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с пост-тестом Тьюки (при уровне значимости $p \leq 0.05$, GraphPad Prism 7.0). Корреляцию между результатами исследований *in silico* и *in vitro* оценивали с помощью метода ранговой корреляции Спирмена (GraphPad Prism 7.0). Основные статистические характеристики получены с применением Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования был выбран пул соединений, представляющий собой ряд пяти-шестичленных гетероциклов с постепенно возрастающей молекулярной сложностью. Структурным мотивом, присутствующим практически во всех объектах, за исключением простейших уретанов I–III, является фрагмент изоиндола. Известно, что изоиндольное ядро [29] встречается во многих природных субстанциях [30, 31]. Производные изоиндола проявляют широчайший спектр биологической активности, включая противовирусную [32], противоопухолевую [33], ингибирующую PARP [34, 35], антиоксидантную [15] и др.

Структуры соединений представлены на рис. 1.

Результат расчета энергий молекулярных орбиталей

Согласно [36–38], значения энергий молекулярных орбиталей служат эффективными предикторами антигликирующей активности соединений. В данном исследовании для расчета энергий граничных молекулярных орбиталей использован метод *ab initio* и базисный набор функций 6-311G(d, p) [36]. Результаты расчета представлены в табл. 1. Данные дополнены рассчитанными значениями разностей E_{HOMO} и E_{LUMO} для α и β орбиталей.

Показано, что соединения этого ряда имеют идентичные значения энергий α и β орбиталей, которые, очевидно, могут взаимозаменяемо использоваться в прогнозировании активности.

Результат исследования антигликирующих свойств соединений

Согласно [28], использованный нами диапазон длин волн возбуждения/испускания соответствует конечным продуктам "гликирования и окисления", определяемым в коже у лиц без сахарного диабета. В ходе исследования антигликирующих свойств соединений I–XIX в концентрации 100 мкМ данный вид активности выявлен у соединений VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIX. Показано, что наивысшей активностью обладают соединения VIII и XIX – производные изоиндола[2,1-*a*]хинолина и цикло-

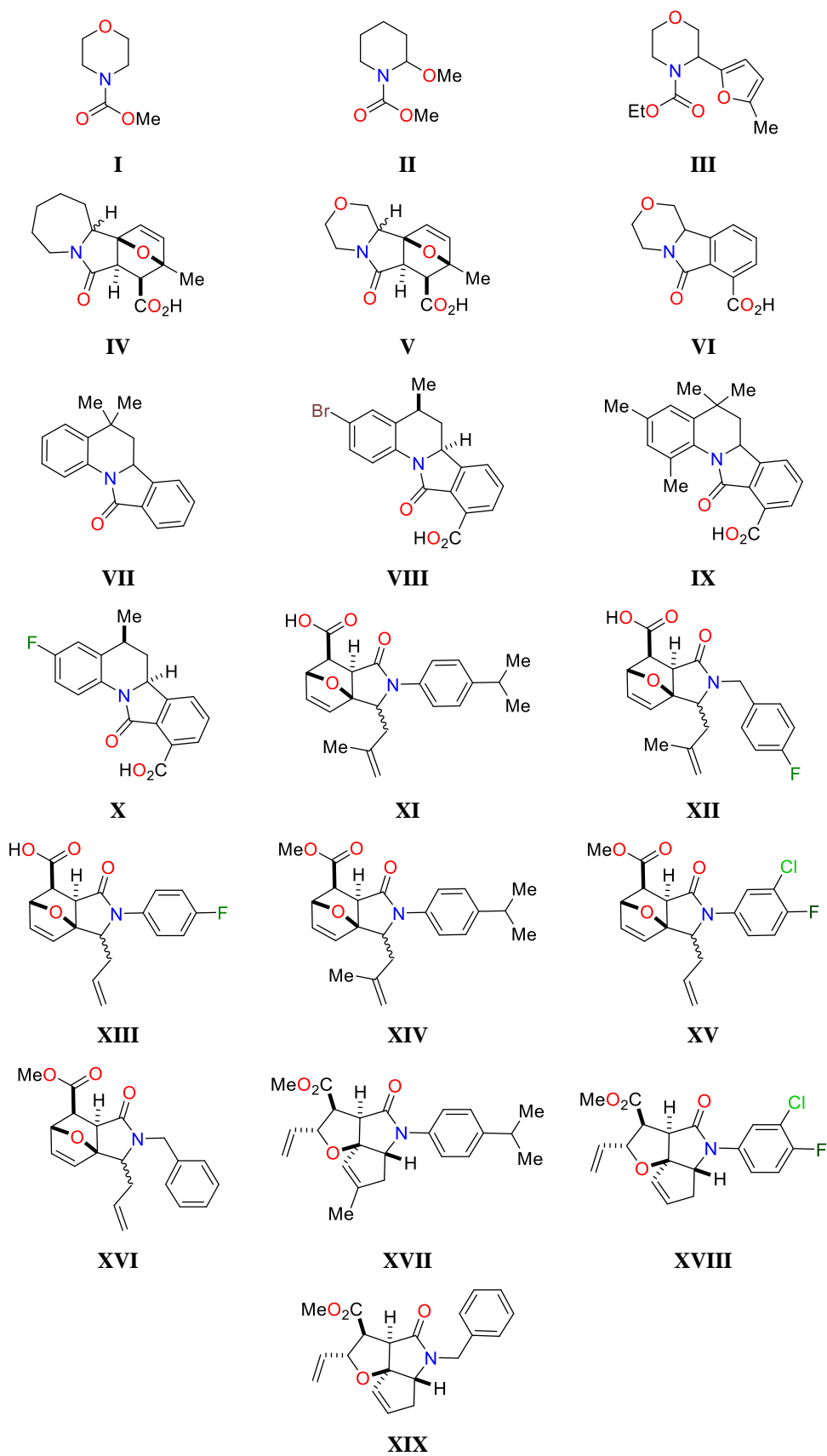


Рис. 1. Структуры соединений I–XIX.

Таблица 1. Расчетные значения $E_{\text{НОМО}}$ и $E_{\text{ЛУМО}}$ для α и β орбиталей, а также рассчитанные разности $E_{\text{НОМО}}$ и $E_{\text{ЛУМО}}$ для α и β орбиталей, eV

Шифр соединения	$E_{\text{НОМО}\alpha}$	$E_{\text{ЛУМО}\alpha}$	$E_{\text{НОМО}\beta}$	$E_{\text{ЛУМО}\beta}$	$\Delta E_{\text{НОМО-ЛУМО}\alpha}$	$\Delta E_{\text{НОМО-ЛУМО}\beta}$
I	-10.169	4.177583	-10.169	4.177583	-14.3466	-14.3466
II	-10.0979	4.062695	-10.0979	4.062695	-14.1606	-14.1606
III	-8.31386	3.863211	-8.31386	3.863211	-12.1771	-12.1771
IV	-9.941913	3.694689	-9.941881	3.694695	-13.636602	-13.636576
V	-9.974618	3.610861	-9.974618	3.610861	-13.585479	-13.585479
VI	-9.735819	1.908716	-9.735814	1.908711	-11.644535	-11.644525
VII	-8.226735	2.45935	-8.226732	2.459348	-10.686085	-10.68608
VIII	-8.42344	1.877579	-8.42344	1.877579	-10.301	-10.301
IX	-8.24331	2.057636	-8.24331	2.057637	-10.300946	-10.300947
X	-8.450796	1.933979	-8.450796	1.933979	-10.384775	-10.384775
XI	-8.725133	3.510208	-8.725133	3.510208	-12.235341	-12.235341
XII	-9.108642	3.118177	-9.108641	3.118177	-12.226819	-12.226818
XIII	-9.141341	3.133079	-9.141421	3.133148	-12.27442	-12.274569
XIV	-8.711815	3.528988	-8.711815	3.528988	-12.240803	-12.240803
XV	-9.324198	2.817744	-9.324198	2.817744	-12.141942	-12.141942
XVI	-9.002651	3.442421	-9.002651	3.442421	-12.445072	-12.445072
XVII	-8.93575	3.407409	-8.93574	3.407408	-12.3432	-12.3432
XVIII	-9.54579	2.603809	-9.54579	2.603809	-12.1496	-12.1496
XIX	-8.98519	3.499902	-8.98519	3.499902	-12.4851	-12.4851
Пиридоксамин	-8.69346	3.04026	-8.69346	3.040257	-11.7337	-11.7337

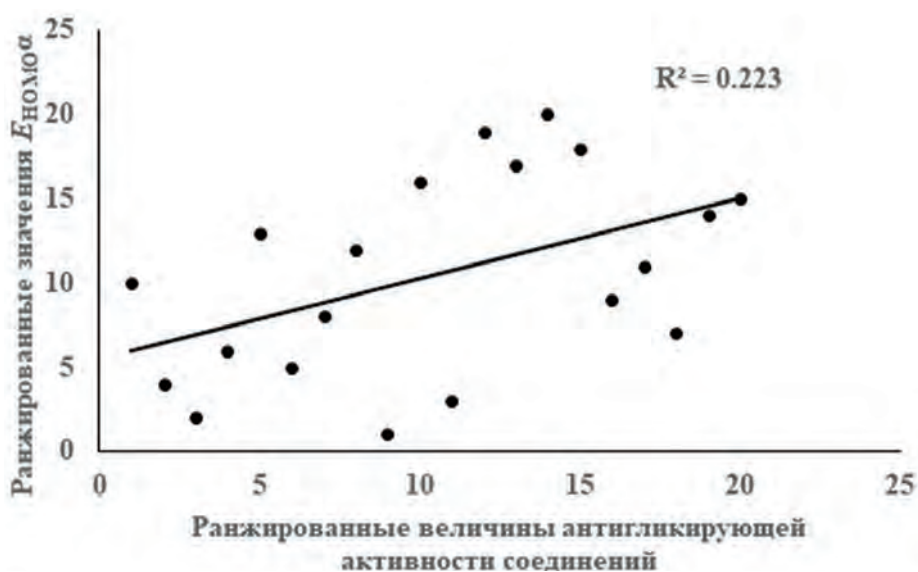


Рис. 2. Графическое представление корреляции рангов антигликирующей активности соединений и их расчетных значений $E_{\text{НОМО}\alpha}$.

пента[*b*]фуоро[2,3-*c*]пирролкарбоновой кислоты соответственно. Результаты определения активности соединений представлены в табл. 2.

Таблица 2. Величины активностей соединений в концентрации 100 мкМ

Шифр соединения	Активность, %
I	8.0 ± 10.2
II	9.3 ± 9.8
III	12.2 ± 9.1
IV	8.3 ± 3.9
V	4.5 ± 7.1
VI	16.1 ± 2.4
VII	18.7 ± 2.2*
VIII	38.6 ± 7.1*
IX	34.0 ± 1.1*
X	26.4 ± 2.5*
XI	24.2 ± 2.1*
XII	19.5 ± 1.3*
XIII	28.4 ± 1.2*
XIV	-2.5 ± 0.8
XV	-3.8 ± 0.9
XVI	-0.3 ± 0.6
XVII	3.8 ± 2.9
XVIII	-10.4 ± 14.7
XIX	49.3 ± 6.9*
Пиридоксамин	33.7 ± 2.0*

*Статистически значимые отличия от контроля (растворителя), ANOVA, $p < 0.05$.

Обращает на себя внимание статистически значимая корреляция результатов *in silico* и *in vitro* исследований (метод ранговой корреляции Спирмена). Обнаружена корреляция рангов между значениями $E_{\text{НОМО}}$ и величинами антигликирующей активности ($r_s = 0.472$, $p = 0.036$). Наблюдение согласуется с результатами ранее проведенных исследований [36–38]. Выявленная корреляция графически представлена на рис. 2. На основании полученных данных можно предположить, что соединения с наивысшей активностью характеризуются наименее отрицательными значениями $E_{\text{НОМО}}$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гликирование – это комплексный процесс, а проявления антигликирующей активности мо-

гут определяться различными механизмами (связывание карбонильных соединений, инактивация активных форм кислорода и др.). Пути образования продуктов реакции гликирования, связанные с окислением, т.е. пути гликоокислации (включая окислительный распад продуктов Амадори и образование некоторых карбонильных соединений) тесно сопряжены с процессами, способными протекать в отсутствие окисления [27].

Флуоресцирующие при длинах волн 440/520 нм продукты относятся к конечным продуктам “гликирования и окисления”, определяемым в коже индивидов без сахарного диабета [28]. При этом прирост специфической аутофлуоресценции кожи при данных длинах волн возбуждения/испускания коррелирует с календарным возрастом обследованных [28]. Сами продукты остаются неохарактеризованными, однако нельзя исключать, что они образуются и в ходе воспроизведенной нами реакции (гипотеза требует дальнейшего изучения). Можно также предположить, что специфическая аутофлуоресценция кожи при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм может применяться для оценки биологического возраста человека, а сами продукты, определяемые при данных параметрах, могут быть связаны с патогенезом заболеваний, ассоциируемых с пожилым возрастом (гипотеза требует изучения и проверки). С одной стороны, такая гипотеза повышает интерес к самим указанным продуктам, с другой – определяет преимущества их измерения при поиске антигликирующих свойств у соединений, способных защищать внеклеточный матрикс. Несмотря на отсутствие убедительных доказательств того, что в коже человека обнаруживаются те же флуоресцирующие продукты, что и в реакции глюкозы и БСА, представленные аргументы обосновывают выбор тех длин волн, которые обычно не используют в подобных исследованиях. Эти доводы подчеркивают потенциальную значимость данных длин волн для определения специфических продуктов гликирования и окисления, что может способствовать более точной оценке воздействия исследуемых соединений на биологические процессы, связанные с возрастными изменениями и патогенезом возрастных заболеваний.

В ходе исследования установлено, что соединения с наивысшей активностью имеют наименее отрицательные значения $E_{\text{НОМО}}$. Традиционно зависимость активности от структуры соединения (SAR – structure-activity relationship) рассматривается в контексте вклада определенных химических групп или заместителей в результирующую активность. Однако выявленная зависимость антигликирующей активности от $E_{\text{НОМО}}$ также может быть интерпретирована как форма SAR. Анализ вклада структурных фрагментов в проявление активности показал, что наибольшая активность свойственна соединениям с изоиндоло-

новым циклом, конденсированным с пяти- или шестичленным кольцом (бензольным, тетрагидрофурановым или хинолиновым). Таким образом, анализ SAR, проведенный нами, включал оценку вклада как структурных фрагментов, так и квантово-химических расчетных параметров в биологическую активность соединений.

Сложность механизмов гликирования объясняет, почему ранее отмечали зависимость антигликирующей активности соединений от множества расчетных параметров, помимо $E_{\text{НОМО}}$, таких как E_{LUMO} и $\Delta E_{\text{НОМО-LUMO}}$. В то же время, установленная в настоящем исследовании корреляция активности соединений с величинами $E_{\text{НОМО}}$ согласуется с ранее описанной зависимостью антигликирующей активности производных нитротриадиазоло[3,2-*a*]пиримидина от данного параметра, установленной с применением машинного обучения [38]. Следует отметить, что ранее значения энергий молекулярных орбиталей сопоставляли с результатами оценки антигликирующей активности соединений при иных параметрах определения флуоресцирующих КПП (обычно использовали длины волн возбуждения/испускания 370/440 нм), или с полученными с использованием методик, основанных на иных принципах (не связанных с флуоресценцией).

Таким образом, представленные результаты *in vitro* и *in silico* и их корреляция, обнаруженная в ходе исследования, являются доводами в пользу использования как прогностического, так и описанного экспериментального подходов для оценки способности химических соединений замедлять образование продуктов гликирования и окисления. Возможно, именно тех продуктов, увеличение количества которых коррелирует с календарным возрастом и может быть связано с возрастными изменениями внеклеточного матрикса.

Коллектив авторов выражает признательность А.А. Москалеву за всестороннюю поддержку в разработке геропротекторов и изучении роли внеклеточного матрикса в процессе старения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Администрации Волгоградской области № 24-24-20112, <https://rscf.ru/project/24-24-20112/>.

В исследовании отсутствовали эксперименты, включающие участие животных или людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kular J.K., Basu S., Sharma R.I. (2014) The extracellular matrix: structure, composition, age-related

differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J. Tissue Eng.* **5**, 2041731414557112. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>

2. Zhang W., Liu Y., Zhang H. (2021) Extracellular matrix: an important regulator of cell functions and skeletal muscle development. *Cell Biosci.* **11**, 65. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00579-4>
3. Godfrey M. (2009) Extracellular matrix. In: *Asthma and COPD*. Elsevier Ltd. 265–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374001-4.00022-5>
4. Dalal A.R., Pedroza A.J., Yokoyama N., Nakamura K., Shad R., Fischbein M.P. (2021) Abstract 13386: Extracellular matrix signaling in Marfan syndrome induced pluripotent stem cell derived smooth muscle cells. *Circulation.* **144**, A13386. https://doi.org/10.1161/circ.144.suppl_1.13386
5. Kingsbury K.D., Skeie J.M., Cosert K., Schmidt G.A., Aldrich B.T., Sales C.S., Weller J., Kruse F., Thomas S.M., Schlötzer-Schrehardt U., Greiner M.A. (2023) Type II diabetes mellitus causes extracellular matrix alterations in the posterior cornea that increase graft thickness and rigidity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **64**(7), 26. <https://doi.org/10.1167/iovs.64.7.26>
6. Ziyadeh F.N. (1993) The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* **22**(5), 736–744. [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(12\)80440-9](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(12)80440-9)
7. Statzer C., Park J.Y.C., Ewald C.Y. (2023) Extracellular matrix dynamics as an emerging yet understudied hallmark of aging and longevity. *Aging. Dis.* **14**(3), 670–693. <https://doi.org/10.14336/AD.2022.1116>
8. Wight T.N., Potter-Perigo S. (2011) The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **301**(6), G950–G955. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00132.2011>
9. Voziyan P., Uppuganti S., Leser M., Rose K.L., Nyman J.S. (2023) Mapping glycation and glycoxidation sites in collagen I of human cortical bone. *BBA Adv.* **3**, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100079>
10. Duran-Jimenez B., Dobler D., Moffatt S., Rabbani N., Streuli C.H., Thornalley P.J., Tomlinson D.R., Gardiner N.J. (2009) Advanced glycation end products in extracellular matrix proteins contribute to the failure of sensory nerve regeneration in diabetes. *Diabetes.* **58**(12), 2893–2903. <https://doi.org/10.2337/db09-0320>
11. Sant S., Wang D., Agarwal R., Dillender S., Ferrell N. (2020) Glycation alters the mechanical behavior of kidney extracellular matrix. *Matrix Biol. Plus.* **8**, 100035. <https://doi.org/10.1016/j.mbps.2020.100035>
12. Kim H.J., Jeong M.S., Jang S.B. (2021) Molecular characteristics of RAGE and advances in small-molecule inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(13), 6904. <https://doi.org/10.3390/ijms22136904>
13. Ashwitha Rai K.S., Jyothi Rasmi R.R., Sarnaik J., Kadwad V.B., Shenoy K.B., Somashekarappa H.M.

- (2015) Preparation and characterization of (125) i labeled bovine serum albumin. *Indian J. Pharm. Sci.* **77**(1), 107–110.
<https://doi.org/10.4103/0250-474x.151589>
14. Rombouts I., Lagrain B., Scherf K. A., Lambrecht M.A., Koehler P., Delcour J.A. (2015) Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation. *Sci. Rep.* **5**, 12210.
<https://doi.org/10.1038/srep12210>
15. Kılıç Süloğlu A., Selmanoglu G., Gündoğdu Ö., Kishali N.H., Girgin G., Palabiyik S., Tan A., Kara Y., Baydar T. (2020) Evaluation of isoindole derivatives: antioxidant potential and cytotoxicity in the HT-29 colon cancer cells. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **353**(11), e2000065.
<https://doi.org/10.1002/ardp.202000065>
16. Jahan H., Siddiqui N.N., Iqbal S., Basha F.Z., Khan M.A., Aslam T., Choudhary M.I. (2022) Indole-linked 1,2,3-triazole derivatives efficiently modulate COX-2 protein and PGE2 levels in human THP-1 monocytes by suppressing AGE-ROS-NF- κ B nexus. *Life Sci.* **291**, 120282.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120282>
17. Shono T., Matsumura Y., Tsubata K., Inoue K., Nishida R. (1983) A new synthetic method of 1-azabicyclo[4.n.0]systems. *Chem. Lett.* **12**(1), 21–24.
<https://doi.org/10.1246/cl.1983.21>
18. Varlamov A.V., Boltukhina E.V., Zubkov F.I., Sidorenko N.V., Chernyshev A.I., Grudin D.G. (2004) Preparative synthesis of 7-carboxy-2-R-isoindol-1-ones. *Chem. Heterocycl. Comp.* **40**, 22–28. <https://doi.org/10.1023/B:COHC.0000023763.75894.63>
19. Toze F.A., Poplevin D.S., Zubkov F.I., Nikitina E.V., Porras C., Khrustalev V.N. (2015) Crystal structure of methyl (3*RS*,4*SR*,4*aRS*,11*aRS*,11*bSR*)-5-oxo-3,4,4*a*,5,7,8,9,10,11,11*a*-deca-hydro-3,11*b*-epoxyazepino[2,1-*a*]isoindole-4-carboxylate. *Acta Cryst. E Crystallogr. Commun.* **71**(Pt 10), o729–o730.
<https://doi.org/10.1107/S2056989015016679>
20. Zubkov F.I., Airiyan I.K., Ershova J.D., Galeev T.R., Zaytsev V.P., Nikitina E.V., Varlamov A.V. (2012) Aromatization of IMDAF adducts in aqueous alkaline media. *RSC Adv.* **2**(10), 4103.
<https://doi.org/10.1039/c2ra20295f>
21. Boltukhina E.V., Zubkov F.I., Nikitina E.V., Varlamov A.V. (2005) Novel approach to isoindolo[2,1-*a*]quinolines: synthesis of 1- and 3-halo-substituted 11-oxo-5,6,6*a*,11-tetrahydroisoindolo[2,1-*a*]quinoline-10-carboxylic acids. *Synthesis*. **2005**(11), 1859–1875.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-869948>
22. Zubkov F.I., Boltukhina E.V., Turchin K.F., Borisov R.S., Varlamov A.V. (2005) New synthetic approach to substituted isoindolo[2,1-*a*]quinoline carboxylic acids via intramolecular Diels–Alder reaction of 4-(*N*-furyl-2)-4-arylamino-1-butene-1 with maleic anhydride. *Tetrahedron*. **61**(16), 4099–4113.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.02.017>
23. Varlamov A.V., Zubkov F.I., Boltukhina E.V., Sidorenko N.V., Borisov R.S. (2003) A general strategy for the synthesis of oxoisoindolo[2,1-*a*]quinoline derivatives: the first efficient synthesis of 5,6,6*a*,11-tetrahydro-11-oxoisoindolo[2,1-*a*]quinoline-10-carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* **44**(18), 3641–3643.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)00705-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)00705-6)
24. Firth J.D., Craven P.G.E., Lilburn M., Pahl A., Marsden S.P., Nelson A. (2016) A biosynthesis-inspired approach to over twenty diverse natural product-like scaffolds. *Chem. Commun.* **52**, 9837–9840.
<https://doi.org/10.1039/c6cc04662b>
25. Zubkov F.I., Zaytsev V.P., Nikitina E.V., Khrustalev V.N., Gozun S.V., Boltukhina E.V., Varlamov A.V. (2011) Skeletal Wagner–Meerwein rearrangement of perhydro-3*a*,6;4,5-diepoxyisoindoles. *Tetrahedron*. **67**(47), 9148–9163.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.09.099>
26. Antonova A.S., Vinokurova M.A., Kumandin P.A., Merkulova N.L., Sinelshchikova A.A., Grigoriev M.S., Novikov R.A., Kouznetsov V.V., Polyanskiy K.B., Zubkov F.I. (2020) Application of new efficient Hoveyda–Grubbs catalysts comprising an *N*→Ru coordinate bond in a six-membered ring for the synthesis of natural product-like cyclopenta[*b*]furo[2,3-*c*]pyrroles. *Molecules*. **25**(22), 5379.
<https://doi.org/10.3390/molecules25225379>
27. Cho S.J., Roman G., Yeboah F., Konishi Y. (2007) The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *Curr. Med. Chem.* **14**(15), 1653–1671.
<https://doi.org/10.2174/092986707780830989>
28. Beisswenger P.J., Howell S., Mackenzie T., Corstjens H., Muizzuddin N., Matsui M.S. (2012) Two fluorescent wavelengths, 440(ex)/520(em) nm and 370(ex)/440(em) nm, reflect advanced glycation and oxidation end products in human skin without diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* **14**(3), 285–292.
<https://doi.org/10.1089/dia.2011.0108>
29. Weintraub R.A., Wang X. (2023) Recent developments in isoindole chemistry. *Synthesis*. **55**(04), 519–546.
<https://doi.org/10.1055/s-0042-1751384>
30. Speck K., Magauer T. (2013) The chemistry of isoindole natural products. *Beilstein J. Org. Chem.* **9**, 2048–2078.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.9.243>
31. Upadhyay S.P., Thapa P., Sharma R., Sharma M. (2020) 1-Isoindolinone scaffold-based natural products with a promising diverse bioactivity. *Fitoterapia*. **146**, 104722.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104722>
32. Csende F., Porkoláb A. (2020) Antiviral activity of isoindole derivatives. *J. Med. Chem. Sci.* **3**(3), 254–285.
<https://doi.org/10.26655/jmchemsci.2020.3.7>
33. Bhatia R.K. (2017) Isoindole derivatives: propitious anticancer structural motifs. *Curr. Top. Med. Chem.* **17**(2), 189–207.
<https://doi.org/10.2174/1568026616666160530154100>
34. Kirby I.T., Cohen M.S. (2019) Small-molecule inhibitors of PARPs: from tools for investigating ADP-ribosylation to therapeutics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **420**, 211–231.
https://doi.org/10.1007/82_2018_137

35. Papeo G., Orsini P., Avanzi N.R., Borghi D., Casale E., Ciomei M., Cirila A., Desperati V., Donati D., Felder E.R., Galvani A., Guanci M., Isacchi A., Posterl H., Rainoldi S., Riccardi-Sirtori F., Scolaro A., Montagnoli A. (2019) Discovery of stereospecific PARP-1 inhibitor isoindolinone NMS-P515. *ACS Med. Chem. Lett.* **10**(4), 534–538. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00569>
36. Ozerov A., Merezhkina D., Zubkov F.I., Litvinov R., Ibragimova U., Valuisky N., Borisov A., Spasov A. (2024) Synthesis and antiglycation activity of 3-phenacyl substituted thiazolium salts, new analogs of Alagebrum. *Chem. Biol. Drug Des.* **103**(1), e14391. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14391>
37. Litvinov R.A., Vasil'ev P.M., Brel' A.K., Lisina S.V. (2021) Frontier molecular orbital energies as descriptors for prediction of antiglycating activity of N-hydroxybenzoyl-substituted thymine and uracil. *Pharm. Chem. J.* **55**(7), 648–654. <https://doi.org/10.1007/s11094-021-02474-1>
38. Savateev K., Fedotov V., Butorin I., Eltsov O., Slepukhin P., Ulomsky E., Rusinov V., Litvinov R., Babkov D., Khokhlacheva E., Radaev P., Vassiliev P., Spasov A. (2020) Nitrothiadiazolo[3,2-a]pyrimidines as promising antiglycating agents. *Eur. J. Med. Chem.* **185**, 111808. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111808>

Antiglycation Activity of Isoindole Derivatives and Its Prediction Using Frontier Molecular Orbital Energies

U. M. Ibragimova¹, N. V. Valuisky¹, S. A. Sorokina¹, X. I. Zhukova¹,
V. R. Raiberg¹, R. A. Litvinov^{1, 2, *}

¹Volgograd State Medical University, Volgograd, 400066 Russia

²Volgograd Medical Scientific Center, Volgograd, 400066 Russia

*e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

The extracellular matrix (ECM) provides structural support and regulates cellular activity. Its disruption during metabolic pathologies or aging can lead to disease development. Developing ECM protectors is crucial for the etiological prevention and treatment of pathologies associated with ECM alterations. Key mechanisms of pathological changes in the ECM include non-enzymatic reactions such as glycation and glycooxidation. The potential of agents as ECM protectors can be assessed by their ability to inhibit these processes. In this study, compounds based on heterocyclic scaffolds, including partially hydrogenated isoindole fragments, were investigated for their ability to slow down the formation of advanced glycation end-products (AGEs). The study employed a combination of *in silico* and *in vitro* approaches. In the *in silico* study, the energies of the frontier molecular orbitals of the compounds were determined using the *ab initio* method with the 6-311G(d,p) basis set. Their antiglycation activity was then investigated in the glycation reaction of bovine serum albumin (BSA) with glucose, using albumin as a model protein. Pyridoxamine served as a reference compound. The antiglycation activity of the compounds was evaluated spectrofluorometrically by measuring the fluorescent products at excitation/emission wavelengths of 440/520 nm, which are not typically used for assessing antiglycation properties. At these wavelengths, glycation and oxidation products in human skin can be detected, which correlate with chronological age, unlike some other glycation products. Experimentally, it was found that the energies of the frontier molecular orbitals of the compounds can serve as predictors of their ability to slow down the formation of fluorescent products detected at 440/520 nm. Inhibiting the formation of such products may be significant for the treatment and prevention of diseases, including metabolic, fibrotic, or age-associated conditions. It was also established that at a concentration of 100 μ M, the antiglycation properties are most pronounced in the series of hydrogenated 3a,6-epoxyisoindole-7-carboxylic acids (compounds of type **XIII**) and cyclopenta[*b*]furo[2,3-*c*]pyrrole-3-carboxylic acids (structures of type **XIX**).

Keywords: glycation, oxidation, extracellular matrix, albumin, cyclopenta[*b*]furo[2,3-*c*]pyrrole, 3a,6-epoxyisoindole

НОВЫЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВОЗРАСТЗАВИСИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

© 2024 г. Л. М. Ермакова^a, Е. А. Давыдова^{a, *}, Е. В. Кондакова^a,
К. В. Кучин^b, М. В. Ведунова^a

^aИнститут биологии и биомедицины, Нижегородский государственный университет
им. Лобачевского, Нижний Новгород, 603022 Россия

^bКлиническая больница № 38, Нижний Новгород, 603000 Россия

*e-mail: spring_dusk@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2024 г.

После доработки 09.07.2024 г.

Принята к публикации 12.07.2024 г.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются преобладающей причиной смертности во всем мире, при этом риск развития этой патологии увеличивается с возрастом, хотя все заметнее тенденция ее “омоложения”. В настоящее время считается, что в генезе ССЗ ключевую роль играют эпигенетические модификации, которые влияют на сложные взаимодействия между изменчивостью генотипа и фенотипа. Таким образом, выявление эпигенетических маркеров ССЗ позволит лучше понять молекулярные механизмы патогенеза этих болезней человека. В проведенном исследовании мы выявляли эпигенетические маркеры, ассоциированные с возрастными изменениями в сердечно-сосудистой системе человека. В результате найдена четкая корреляция с возрастом двух кардиологических параметров: напряжения зубца R в усиленном отведении от левой руки (RaVL) и скорости каротидно-бедренной пульсовой волны (кфСРПВ). Кроме того, используя массив Illumina EPIC, мы продемонстрировали сильную корреляционную связь этих параметров с уровнем метилирования ДНК в 21 CpG-сайте генома. Важно, что многие из этих CpG-сайтов ассоциированы с генами, задействованными в развитии патологий сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: старение, биологический возраст, хронологический возраст, сердечно-сосудистые заболевания, CpG-сайты, метилирование ДНК, электрокардиограмма, сфигмография

DOI: 10.31857/S0026898424060161, **EDN:** HZSYRB

ВВЕДЕНИЕ

Старение – это сложный и многофакторный процесс, характеризующийся постепенными функциональными нарушениями органов и систем. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают особое место среди основных причин смертности во всем мире. Возрастные изменения в системе кровообращения играют важнейшую роль в общем старении организма, существенно изменяя его адаптационные возможности и создавая благоприятную среду для

возникновения таких патологических состояний, как атеросклероз, гипертония, ишемическая болезнь сердца (ИБС), нарушение церебральной циркуляции. Всестороннее понимание физиологических аспектов старения позволило выявить различные изменения, происходящие со временем и в сердечно-сосудистой системе. Это истощение более чем трети кардиомиоцитов к 80-летнему возрасту, фиброз тканей, гипертрофия левого желудочка, дегенерация капиллярного русла, нарушение регуляции метаболизма кальция, активация окислительного стресса,

Сокращения: ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия; ГМ – гипертрофия миокарда; ДАД – диастолическое артериальное давление; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИМ – инфаркт миокарда; ИМТ – индекс массы тела; КМП – кардиомиопатия; кфСРПВ – каротидно-фemorальная скорость распространения пульсовой волны; ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс; ОАК – общий анализ крови; ПАД – пульсовое артериальное давление; САД – систолическое артериальное давление; СД2 – сахарный диабет второго типа; СНТ – сайт начала транскрипции; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ЭКГ – электрокардиограмма; LYM (lymphocytes) – лимфоциты; MCV (mean corpuscular volume) – средний объем эритроцитов; RaVL (R wave voltage in the enhanced left arm lead) – напряжение зубца R в усиленном отведении от левой руки; RDW-CV (relative width of the red blood cell distribution by volume) – относительная ширина распределения эритроцитов по объему; WBC (white blood cells) – лейкоциты.

снижение чувствительности β -адренорецепторов, пиковой частоты сердечных сокращений и многое другое [1–3]. В совокупности все эти факторы снижают адаптационный потенциал организма при динамической физической нагрузке и приводят к развитию гипоксии, усилению свободнорадикальных процессов и воспалению [4]. Хотя старение сердечно-сосудистой системы – неотвратимый естественный процесс, внедрение современных технологий, таких как инженерия сердечной ткани [5] и хемогенетика [6], уже позволяет решать многие проблемы в этой области.

Современные критерии, используемые для оценки возрастных изменений миокарда в клинической практике, часто сосредоточены на диагностике патологических изменений и упускают из виду нюансы скорости старения сердечно-сосудистой системы. В связи с этим разработка предиктора биологического возраста сердечно-сосудистой системы имеет важное прогностическое значение, так как позволит предсказать ее возрастные изменения задолго до клинических проявлений. В научной литературе давно обсуждается решающая роль эпигенетических модификаций в прогрессировании ССЗ [7–9]. Однако изменения в эпигенетическом паттерне генома часто специфичны для определенного типа клеток. В связи с этим приходится вводить стадию выделения тех или иных клеток для последующего анализа их генома. При проведении исследований на сердечной ткани возникают чисто технические сложности. Тем не менее, не так давно двумя группами исследователей изучены механизмы эпигенетической регуляции в клетках сердца человека [7, 10].

Несмотря на тканезависимый характер изменений в метилировании геномной ДНК при старении, уже идентифицированы универсальные предикторы – общие для различных типов тканей и клеток [8]. Эти предикторы отражают возрастные изменения в метилировании многочисленных индивидуальных CpG-сайтов, ассоциированных со старением и часто связанных с активностью определенных генов. Например, для часов Хорвата, основанных на степени метилирования 353 участков CpG, продемонстрирована четкая “работа” в различных тканях и типах клеток [11]. В некоторых исследованиях уровни метилирования определенных CpG в ДНК лейкоцитов использовали в качестве биомаркеров для прогнозирования доклинического развития инфаркта миокарда (ИМ) и ИБС [12–14].

Таким образом, идентификация в цельной крови эпигенетических маркеров состояния сердечно-сосудистой системы позволит проводить раннюю диагностику развития ССЗ, причем с минимальным инвазивным вмешательством, а значит своевременно назначать превентивную

или профилактическую терапию. Целью проведенного нами исследования был поиск эпигенетических и функциональных маркеров, ассоциированных со старением сердечно-сосудистой системы человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Исследование проводили с использованием данных электрокардиографии (ЭКГ) и сфигмографии, полученных от условно здоровых добровольцев, проживающих в Нижегородской области (Россия). Исследуемая группа состояла из 48 человек (33% мужчин, 67% женщин) в возрасте от 25 до 85 лет, случайным образом выбранных из более обширной группы – 516 участников. От каждого участника было получено информированное согласие. Из исследования были исключены участники, в анамнезе которых были такие заболевания, как ИМ, инсульт, операции на сердце, стенокардия, сахарный диабет 2 типа (СД2), онкология, а также острые респираторные вирусные инфекции в течение 14 дней, предшествовавших обследованию. Также были исключены беременные женщины. Образцы венозной крови, собранные в вакутейнеры с антикоагулянтами К3-ЭДТА и Li-гепарин (“Greiner Bio-One”, Австрия), использовали для определения биологического и эпигенетического возраста. Исследование проводили на кафедре общей и медицинской генетики ФГАОУ ВО “Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского”.

Методы. Для оценки функционального состояния сосудистой стенки проводили многоканальную объемную сфигмографию на аппарате BOSO ABI-SYSTEM 100 (“BOSCH + SOHN GmbH u. Co. KG”, Германия). В ходе статистической обработки анализировали различные показатели, связанные с сосудистой стенкой и риском ССЗ, в том числе лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) для правой и левой конечностей, каротидно-феморальную скорость распространения пульсовой волны (кфСРПВ), диастолическое артериальное давление (ДАД), систолическое артериальное давление (САД), пульсовое артериальное давление (ПАД), частоту пульса, индекс массы тела (ИМТ), наличие нарушений сердечного ритма. Критерии выявления повреждения сосудистой стенки включали ПАД ≥ 60 мм рт.ст., кфСРПВ > 10 м/с и ЛПИ < 0.9 . ЛПИ представляет собой отношение САД, измеряемого на лодыжке, к САД, измеряемому на плечах. Этот индекс служит показателем степени стеноза или окклюзии артерий нижних конечностей вследствие атеросклероза. При скрининговом тестировании ЛПИ дает ценную информацию о состоянии периферических артерий, особенно у лиц, подверженных повышенному риску ССЗ [15, 16].

ЭКГ-исследование проводили утром в специально оборудованном помещении при температуре от 23°C до 25°C. Сфигмографию проводили в положении испытуемого лежа на спине после 5-минутной адаптации. Для регистрации ЭКГ использовали 3-канальный портативный электрокардиограф SCHILLER CARDIOVIT-AT101 (“Schiller”, Швейцария), оснащенный программным обеспечением SEMA-200. Параметры фиксировали в стандартных грудных отведениях (V1, V2, V3, V4, V5, V6), стандартных отведениях от конечностей (I, II, III) и усиленных отведениях от конечностей (aVR, aVL). Анализируемые показатели включали длительность интервалов QTc, PQ и QRS в мс, а также амплитуду SV1, RV5, RV6, RaVL, SV3 и SV5 в мВ.

Манипуляции с ДНК. ДНК из цельной крови выделяли фенол-хлороформным методом. Для количественного анализа выделенной ДНК использовали набор Qubit dsDNA BR Assay (“Thermo Fisher Scientific”, США), после чего проводили бисульфитную конверсию 250 нг ДНК, используя набор EpiMark Bisulfite Conversion Kit (“New England Biolabs”, США).

Технологию Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip [17] использовали в соответствии с инструкциями производителя. Данный подход позволяет оценить уровни метилирования ДНК в 866 836 CpG-сайтах. После исключения некоторых зондов и обработки данных, как подробно описано нами ранее [4], число анализируемых CpG-сайтов сократилось до 733 923. Функциональную нормализацию необработанных данных метилирования выполняли с использованием пакета minfi R (1.45.0) [18].

Определение возраста. В исследовании использовали четыре метода оценки *эпигенетического возраста*: DNAmAgeHannum [19], DNAmAge [11], DNAmPhenoAge [20] и DNAGrimAge [21]. Модель DNAmAgeHannum определяет скорость старения метилома человека в цельной крови. Мультигетканевой предиктор возраста DNAmAge основан на оценке уровня метилирования ДНК в различных тканях и клетках. Биомаркер старения DNAmPhenoAge был разработан с учетом комплексных клинических показателей фенотипического возраста [20]. DNAmGrimAge — составной биомаркер, основанный не только на анализе метилирования ДНК, но и на некоторых белках плазмы и истории курения. Данные для всех моделей были обработаны с помощью калькулятора Хорвата (<https://dnamage.genetics.ucla.edu/home/>).

Для определения *биологического возраста* применяли модель PhenoAge [20]. Она включает следующие параметры: общее количество лейкоцитов (WBC), средний объем эритроцитов (MCV), процентное содержание лимфоцитов (LYM, %),

относительная ширина распределения эритроцитов по объему (RDW-CV, %) и биохимические показатели (альбумин, глюкоза, креатинин, щелочная фосфатаза, С-реактивный белок), а также хронологический возраст. Значения всех показателей рассчитывали по результатам общего анализа крови (ОАК) и биохимического анализа на полуавтоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior 30 (“Diatron”, Венгрия) и биохимическом анализаторе StatFax 3300 (“Awareness Technology”, США) с использованием диагностических наборов АО “ДИАКОН-ДС” (Россия).

Статистический анализ данных. Извлечение данных по метилированию ДНК из исследуемого массива проводили с помощью Python 3.11.6 и его пакета pandas 1.5.3. Статистический анализ включал оценку нормальности распределения данных, создание корреляционной матрицы и построение графиков корреляции с помощью R 4.3.1 и пакетов readxl 1.4.3, stringr 1.5.0, ggcorrplot 0.1.4.1. Проверку на нормальность распределения данных проводили с использованием теста Шапиро–Уилка. В случае ненормального распределения данных коэффициенты рассчитывали с использованием корреляции Спирмена.

Также мы оценили мощность коэффициента корреляции в R с использованием пакета rpwg 1.3. Анализ мощности для корреляционного теста основан на следующих компонентах (в скобках указаны значения, принятые в этом исследовании): уровень значимости (0.05), размер выборки ($n = 48$) и значения коэффициента корреляции (r). Мы выбрали 21 CpG-сайт с $r > 0.5$ и номинальным p -value < 0.05 . В результате даже для минимального коэффициента корреляции ($r = 0.553$), полученного для 21 CpG-сайта, статистическая мощность составила 0.988.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе исследования было проведено изучение взаимосвязи основных параметров ЭКГ и сфигмографии с показателями хронологического, эпигенетического и биологического возраста (рис. 1). Оценивали следующие показатели ЭКГ и сфигмографии: САД, ДАД, ПАД, пульс, кФСРПВ, ЛПИ для правой и левой конечностей, интервалы QTc и PQ, комплекс QRS, амплитуды SV1, RV5, RV6, RaVL, SV3, SV5.

Среди исследуемых показателей сильные корреляционные связи выявлены между параметрами кФСРПВ, RaVL и значениями хронологического, эпигенетического и биологического возрастов ($r > 0.5$). Для других показателей ЭКГ и сфигмографии коэффициенты корреляции с возрастом были ниже ($r < 0.5$), поэтому их не учитывали в дальнейшем исследовании. Кроме того, для некоторых показателей ЭКГ и сфигмографии тоже обнаружена

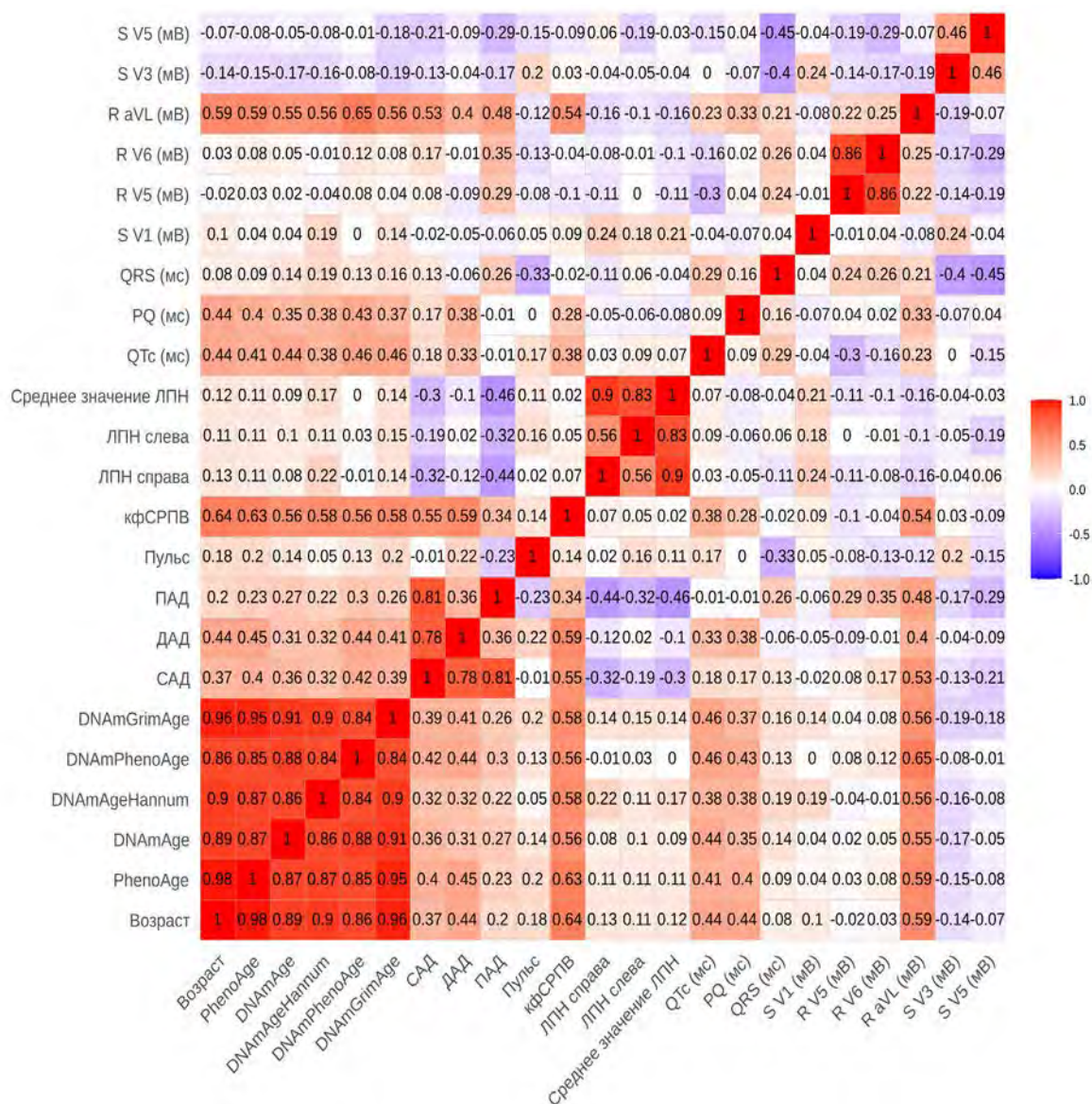


Рис. 1. Матрица корреляции Спирмена, представляющая собой коэффициенты корреляции между функциональными показателями сердечно-сосудистой системы и значениями возраста, полученными с помощью различных моделей, включая хронологический, эпигенетический и биологический возраст ($n = 48$). Эпигенетический и биологический возраст рассчитывали с использованием следующих моделей: DNAmAgeHannum [19], DNAmAge [11], DNAmPhenoAge [20], DNAmGrimAge [21] и PhenoAge [20]. Значения p , связанные с коэффициентами корреляции, приведены в табл. S1 (см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Ermakova_rus.rar).

высокая корреляция. Корреляционные кривые, иллюстрирующие взаимосвязи между кфСРПВ, RaVL и возрастом, представлены на рис. 2.

Также установлена связь между кфСРПВ и RaVL ($r = 0.54$, $p < 0.001$). Показатель RaVL был предложен в качестве чувствительного маркера гипертрофии левого желудочка [22]. Между тем, показатель кфСРПВ, указывающий на внутреннюю жесткость стенки аорты, имеет прогностическое значение, поскольку всесторонне

отражает влияние факторов риска ССЗ на артериальную стенку и неблагоприятное воздействие жесткости аорты на гемодинамику. Это включает в себя повышенное САД и пульсовое давление с повышенной систолической нагрузкой [23], что потенциально приводит к увеличению массы левого желудочка.

На следующем этапе проанализировали зарегистрированные сердечные параметры (кфСРПВ, RaVL) на предмет их связи с уровнем метилирова-

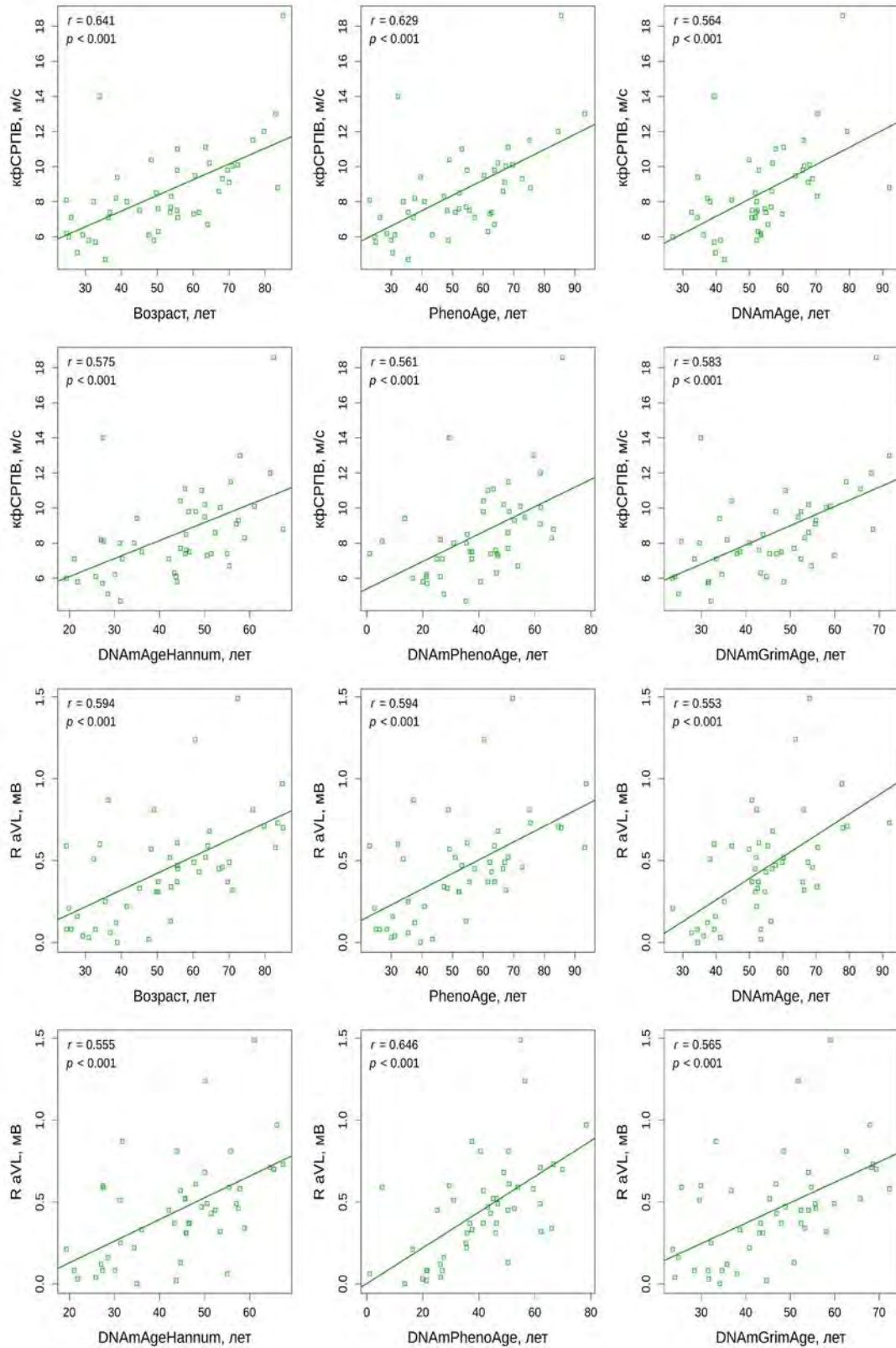


Рис. 2. Связь между кфСРПВ, RaVL и хронологическим, биологическим и эпигенетическим возрастом (n = 48). Здесь и далее: на графиках наряду с линией регрессии приведены величины коэффициента корреляции Спирмена (r) и p-value (p).

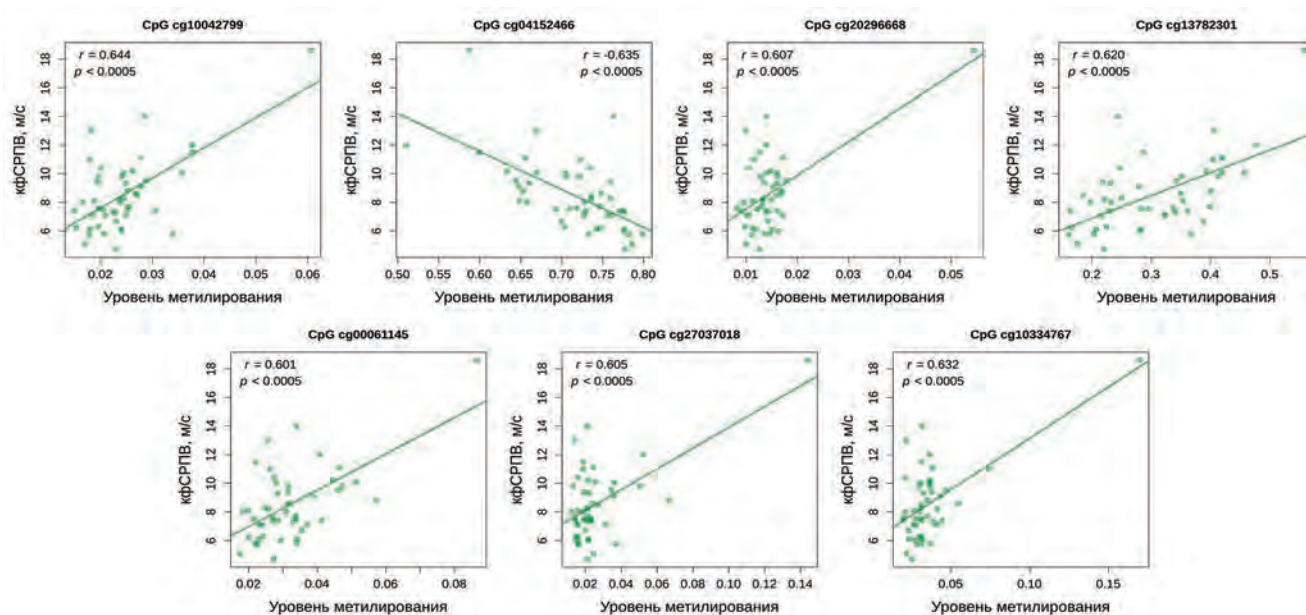


Рис. 3. Связь между кфСРПВ и уровнем метилирования отдельных CpG-сайтов ($n = 48$). Уровни метилирования ДНК оценивали с использованием технологии Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip.

ния ДНК в CpG-сайтах (>700 тыс.). На основании удовлетворения выбранному критерию ($r > 0.6$) отобрали 21 CpG-сайт, для которого выявлена надежная корреляция с исследуемыми сердечными параметрами (рис. 3, рис. 4).

В результате проведенного анализа обнаружено, что 14 CpG-сайтов ассоциировано с RaVL, а 7 — с кфСРПВ. С помощью базы данных Infinium MethylationEPIC v1.0 были определены гены, содержащие выделенные CpG-сайты, а также позиции этих CpG в структуре гена (табл. 1, табл. 2). Названия целевых генов соответствуют базовой сборке GENECODE, где несколько позиций у названия одного и того же гена указывают на варианты сплайсинга.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на достижения современной медицины, ССЗ остаются основной причиной смертности людей старшей возрастной группы. В связи с этим в настоящее время разработано множество маркеров патологических изменений сердечно-сосудистой системы. Однако вопрос о верифицированных маркерах возрастных изменений при физиологическом старении остается не до конца изученным. В то же время преждевременное старение сердечно-сосудистой системы представляет большую угрозу и может стать одной из причин преждевременной смерти и перехода от активного долголетия к старческой астении.

В проведенном исследовании мы оценили взаимосвязь функциональных показателей сердечно-

сосудистой системы с хронологическим, эпигенетическим и биологическим возрастом для выявления наиболее значимых коррелятов. Кроме того, мы изучили корреляцию между этими показателями и метилированием ДНК в более чем в 700 000 CpG-сайтов.

Таким образом, первый этап исследования был направлен на поиск маркеров физиологического старения сердечно-сосудистой системы, ассоциированных с биологическим/эпигенетическим возрастом человека. На сегодняшний день наиболее признанным методом оценки эпигенетического возраста человека считается определение уровня метилирования комплекса эпигенетических маркеров, которые линейно изменяются с возрастом (гипометилирование или гиперметилирование). Этот подход был реализован в различных эпигенетических часах [11, 19–21, 24], однако из-за высокой стоимости и сложности технологии его редко используют в когортных исследованиях. В связи с этим, помимо определения эпигенетического возраста с использованием различных моделей часов, мы использовали более дешевую и доступную технологию определения биологического возраста — модель PhenoAge [20]. В ходе корреляционного анализа выявлены показатели ЭКГ и сфигмографии, наиболее ассоциированные с возрастными изменениями сердечно-сосудистой системы при физиологическом старении. Это RaVL и кфСРПВ. Параметр кфСРПВ — широко признанный показатель жесткости стенки аорты и его значение заметно увеличивается в пожилом возрасте. Ранее сообщалось о линейной зависимости между воз-

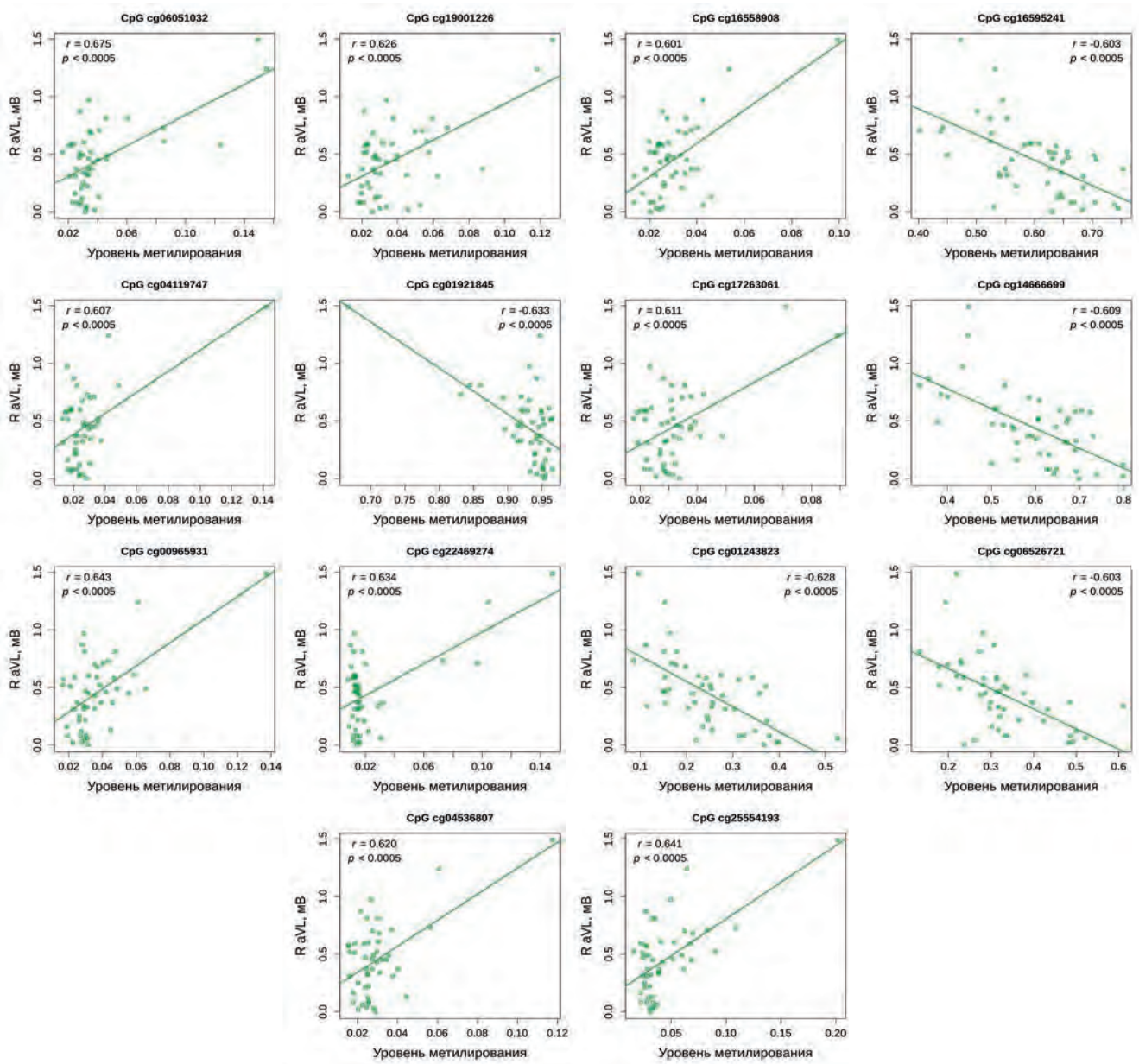


Рис. 4. Связь между RaVL и уровнем метилирования отдельных CpG-сайтов (n = 48).

растом и кфСРПВ [25–28], а потом выявили нелинейность – значительное увеличение кфСРПВ после 50 лет [29]. В свою очередь, RaVL тесно коррелирует с массой левого желудочка [22] и считается надежным критерием гипертрофии левого желудочка как изолированно, так и в составе сложных диагностических моделей [30]. Подобно кфСРПВ, RaVL имеет тенденцию к увеличению с возрастом [31, 32].

На следующем этапе исследования мы провели корреляционный анализ для выявления связи между выбранными параметрами старения

сердечно-сосудистой системы (RaVL и кфСРПВ) и уровнем метилирования ДНК и идентифицировали 21 CpG-сайт как наиболее значимый. В международных базах данных мы не нашли исследований, изучающих связь между параметрами ЭКГ и метилированием ДНК в CpG-динуклеотидах у относительно здоровых добровольцев. Лишь в нескольких исследованиях упоминаются показатели сердечно-сосудистой функции в связи с метилированием ДНК. Например, H. Cronjé с соавт. [33] сообщили о корреляции между показателем кфСРПВ и определенными CpG-сайтами. L. Nascimento и др. [34] оценили

Таблица 1. Ассоциированные с RaVL CpG-сайты и соответствующие им гены

No. CpG	Ген и локализация в нем CpG ^a
cg06051032	<i>ANKRD18B</i> (CHT200)
cg00965931	<i>AC105247.1</i> (CHT200); <i>CABLES1</i> (5'НТП)
cg25554193	<i>NR5A1</i> (5'НТП)
cg22469274	<i>HOXA6</i> (3'НТП; CHT200); <i>HOXA-AS3</i> (5'НТП); <i>HOXA3</i> (3'НТП)
cg19001226	<i>HOXD-AS1</i> (CHT1500; CHT200; 3'НТП); <i>HOXD1</i> (CHT200; 5'НТП; экзон-1)
cg04536807	<i>FKBP9</i> (экзон-1; 5'НТП)
cg17263061	<i>KCNK3</i> (экзон-1; 5'НТП)
cg04119747	<i>FAM123C</i> (CHT200; 5'НТП); <i>AC140481.8</i> (CHT1500)
cg16558908	<i>PHC2</i> (CHT200)
cg16595241	<i>GPR128</i> (CHT200)
cg06526721	<i>PRR16</i> (CHT1500)
cg14666699	<i>C11orf36</i> (CHT1500)
cg01243823	<i>NOD2</i> (5'НТП)
cg01921845	<i>AKT1</i> (3'НТП)

^aОбозначения (здесь и далее): CHT1500 – область, расположенная выше сайта начала транскрипции на расстоянии 200–1500 п.н., CHT200 – область, расположенная выше сайта начала транскрипции на расстоянии 0–200 п.н., 5'НТП – 5'-нетранслируемый регион, 3'НТП – 3'-нетранслируемый регион.

Таблица 2. Ассоциированные с кфСРПВ CpG-сайты и соответствующие им гены

No. CpG	Ген и локализация в нем CpG ^a
cg10042799	<i>GSC</i> (экзон-1)
cg10334767	<i>ZNF518B</i> (CHT200)
cg13782301	<i>PRRT1</i> (3'НТП)
cg20296668	<i>COCH</i> (CHT200; CHT1500)
cg27037018	<i>SLC6A3</i> (CHT200)
cg00061145	<i>ACTA1</i> (CHT1500)
cg04152466	<i>LOC101930010</i> (тело гена); <i>DST</i> (тело гена)

уровень метилирования ДНК некоторых генов у лиц с психическими расстройствами и его связь с ЭКГ-показателями.

Кроме того, ранее выявлено влияние демографических факторов, таких как пол, раса и этническая принадлежность, на развитие ССЗ, в частности ИМ [35–38]. Более того, значения параметров сердечно-сосудистой системы

в нормальном состоянии находятся в широком диапазоне и различаются у мужчин и женщин [39]. В связи с этим возникает необходимость разработки персонализированных критериев, отражающих возрастные изменения сердечно-сосудистой системы, темпы ее старения, а также позволяющих прогнозировать наступление физиологического истощения или возникновение патологических изменений в сердце.

Во многих исследованиях эпигенетические модификации генома, в частности метилирование ДНК в CpG-сайтах, рассматривают как важный механизм, связывающий генетические варианты с риском развития ССЗ (см. обзор [40]). Нам удалось идентифицировать группу CpG-сайтов, связанную с генами, отвечающими за функционирование сердечно-сосудистой системы. По результатам проведенного нами поиска источников, где выявляли связь между параметрами RaVL и кфСРПВ и идентифицированными нами генами, ассоциированными с развитием конкретных заболеваний, мы составили схему, представленную на рис. 5.

Таким образом, в ходе исследования в геноме человека идентифицирован 21 CpG-сайт, уровень метилирования которых значимо коррелирует с кар-

диологическими параметрами кфСРПВ и RaVL, функционально ассоциированными с возрастом.

Как видно из приведенной схемы, гены *HOXD1* и *HOXA6* играют ключевую роль в дифференцировке эндотелиальных клеток, в частности в регуляции их миграции [41]. Метилирование CpG-сайтов в промоторных областях этих генов коррелирует с развитием атеросклероза [42, 43]. Известно, что гены *HOX* связаны с развитием сердца и формированием крупных артерий [44]. В некоторых исследованиях выявлена роль генов *HOX* в развитии ИБС и сердечной недостаточности [45, 46].

Изоформа АКТ-1, экспрессируемая эндотелиальными клетками, играет важную роль в регуляции сердечно-сосудистой функции [47, 48]. Эпигенетические модификации в гене *AKT1* ассоциированы

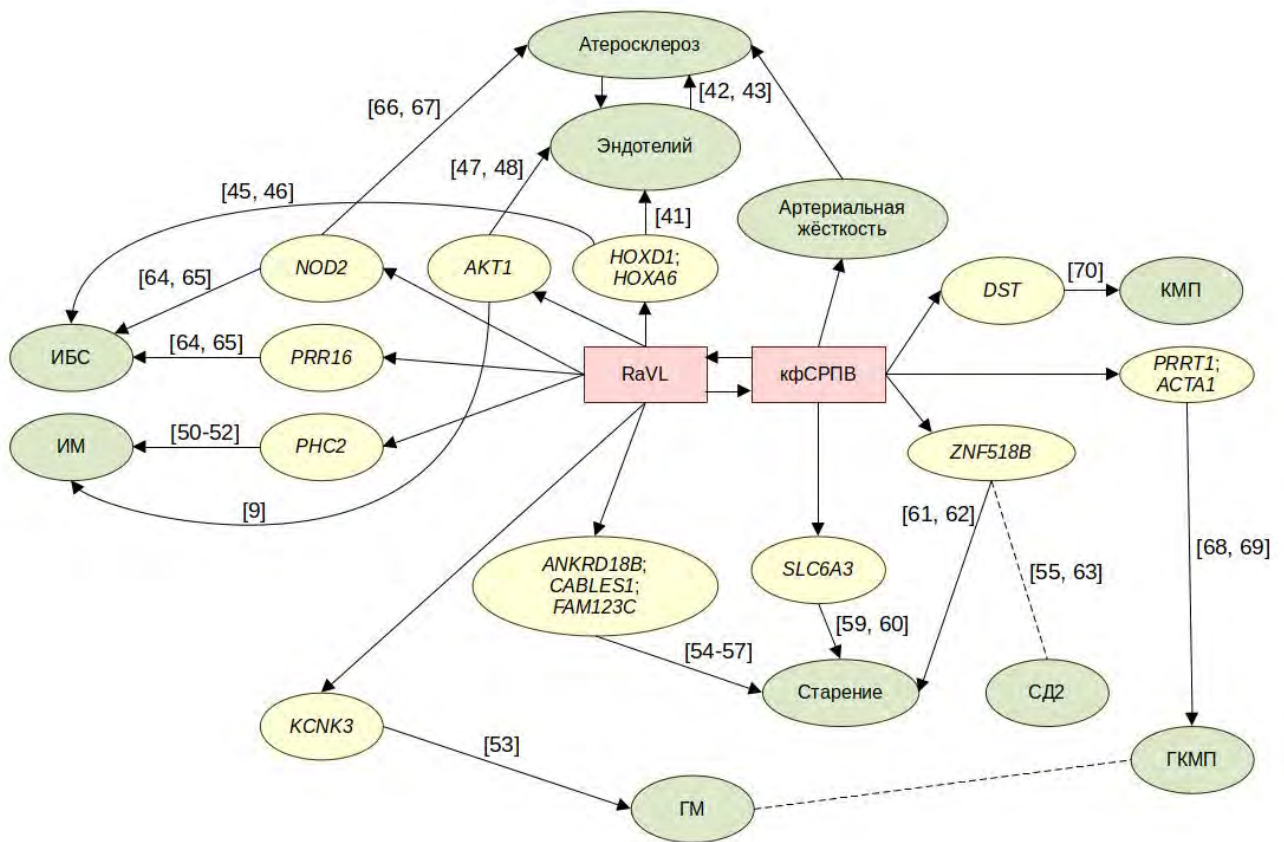


Рис. 5. Схематическое изображение обнаруженных в научной литературе связей между функциональными кардиологическими показателями, генами и патологиями сердечно-сосудистой системы. Обозначения: ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ГМ — гипертрофия миокарда, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, КМП — кардиомиопатия, СД2 — сахарный диабет 2 типа. Розовые прямоугольники обозначают показатели сердечно-сосудистой системы, наиболее ассоциированные с возрастом по результатам проведенного нами исследования. Желтые овалы обозначают гены, содержащие CpG-сайты, уровень метилирования которых высоко коррелировал с выделенными показателями сердечно-сосудистой системы. Зеленые овалы обозначают патологии, ассоциированные с изучаемыми генами и CpG-сайтами. Черные стрелки обозначают прямые связи между исследуемыми параметрами, генами и заболеваниями. Пунктирные линии обозначают косвенную связь. Схема составлена с помощью редактора LibreOffice Draw.

с ИМ [9], а нокаут *AKT1* способствует развитию коронарного атеросклероза у мышей [49].

Ген *PHC2*, связанный с метаболизмом белков, играет решающую роль в патогенезе ИМ и может служить прогностическим маркером рецидивирующего ИМ [50–52]. Ген *KCNK3*, экспрессируемый в кардиомиоцитах правого желудочка, участвует в фазе реполяризации. Снижение экспрессии *KCNK3* наблюдалось при развитии гипертрофии правого желудочка, связанной с легочной гипертензией [53].

Роль других генов в функционировании сердечно-сосудистой системы в настоящее время изучена недостаточно. Некоторые из них связаны с процессом старения. Например, ген *CABLES1* участвует в регуляции гемопоэтического гемостаза в процессе старения [54]; эпигенетические модификации гена *FAM123C* в крови отражают возрастные изменения в островках поджелудочной железы [55], а ген *ANKRD18B* связан с онкологией [56, 57]. Интересно, что подавление экспрессии *CABLES1*, который ингибирует рост клеток, приводит к усилению пролиферации клеток и повышению устойчивости к старению, вызванному ангиотензином II [58]. Установлена связь между геном *SLC6A3* и развитием болезни Паркинсона, причем старение определено как один из основных факторов, способствующих возникновению этого заболевания [59, 60].

Было показано, что экспрессия гена *ZNF518B* значительно снижается с возрастом в различных тканях [61]. Кроме того, было выявлено участие этого гена в миграции опухолевых клеток, вызванной эпигенетическими модификациями [62]. Профили возрастных изменений метилирования ДНК этого гена в крови и островках поджелудочной железы совпадают, что косвенно указывает на связь с развитием СД2 [55, 63].

NOD2 и *PRR16* участвуют в развитии ИБС и последующей гипертрофии, выступая в качестве адаптивного ответа на ССЗ [64, 65]. Полиморфизмы *NOD2* коррелируют с повышенным риском развития атеросклероза [66, 67]. Снижение экспрессии генов *PRRT1* и *ACTA1* регистрируют при ГКМП [68, 69]. Ген *DST* экспрессирует тканеселективную изоформу *Dst-b*, а его мутация у мышей приводит к КМП и аккумуляции митохондрий в поперечнополосатых мышцах, т.е. к миофибриллярной миопатии [70].

Гены гомеобокса, включая *GSC*, кодируют гомеодоменные белки, функционирующие как факторы транскрипции, которые связывают ДНК, регулируют экспрессию генов и контролируют физиологические функции в клетках, тканях и органах. Участие генов гомеобокса в развитии сердечной ткани требует дальнейшего изучения. Предполагается, что мутации в них приводят к дефектам формирования

сердечно-сосудистой системы в эмбриональный период и, как следствие, к смерти или врожденным аномалиям кардиальной функции [71].

Недавно А. Mongelli с соавт. [72] продемонстрировали возможность создания эпигенетических часов для оценки биологического возраста сердца на основе метилирования нескольких CpG-динуклеотидов. М. Krolevets с соавт. [46] на основе данных, ранее опубликованных разными группами исследователей, идентифицировали 5 наиболее значимых CpG-сайтов, ассоциированных с ССЗ. Кроме того, для прогнозирования возраста сердца используют подход, основанный на данных ЭКГ [73–75]. Однако рассчитанный таким образом возраст слабо коррелировал с показателями DNAmAgeHannum, AgeHorvath, PhenoAge и GrimAge [76]. Это подчеркивает необходимость разработки эффективных диагностических инструментов для раннего выявления и лечения ССЗ.

Следует сказать, что проведенное нами исследование исходно имеет несколько ограничений. Во-первых, работа выполнена на небольшой выборке. Во-вторых, мы не оценивали влияние пола на изучаемые параметры, что может быть фактором конфаундера. Тем не менее, нами выявлены функциональные кардиологические показатели, тесно связанные с возрастом, и проанализирована их корреляция с уровнями метилирования отдельных CpG-динуклеотидов. Идентифицирован 21 CpG-сайт, уровень метилирования которых высоко коррелирует с кфСРПВ и RaVL. Следовательно, эти CpG можно рассматривать в качестве потенциальных эпигенетических маркеров для ранней диагностики и лечения ССЗ.

Таким образом, нами выявлена связь параметров сердечно-сосудистой системы, в частности RaVL и кфСРПВ, с уровнями метилирования 21 CpG-сайта в периферической крови. Это важная информация о возрастных изменениях в сердечно-сосудистой системе через призму эпигенетических модификаций. Однако для выяснения клинической значимости выявленных ассоциаций необходимы дополнительные исследования на большей выборке и с учетом ее гендерной структуры.

Мы благодарим Игоря Юсипова и Михаила Кривоносова за помощь в определении биологического и эпигенетического возраста на основе различных моделей.

Данное исследование финансировалось за счет средств бюджета программы “Приоритет-2030”.

В статье не содержится никаких исследований с использованием животных в качестве объектов. Все процедуры, выполненные в ходе исследования с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/

или национального Комитета по этике исследований, а также Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим поправкам или сопоставимым стандартам этики. От каждого из участников, включенных в исследование, было получено информированное добровольное согласие. Исследование проводили на кафедре общей и медицинской генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского”. Протокол исследования получил одобрение на заседании Локального этического комитета (протокол № 1 от 2 декабря 2020 г.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Costantino S., Paneni F., Cosentino F. (2016) Ageing, metabolism and cardiovascular disease. *J. Physiol.* **594**, 2061–2073.
- Özerkan Çakan F. (2017) Changes in cardiovascular physiology in the elderly. *Arch. Turk. Soc. Cardiol.* **45**(Suppl. 5), 5–8.
- Münzel T., Daiber A., Steven S., Tran L.P., Ullmann E., Kossmann S., Schmidt F.P., Oelze M., Xia N., Li H., Pinto A., Wild P., Pies K., Schmidt E.R., Rapp S., Kröller-Schön S. (2017) Effects of noise on vascular function, oxidative stress, and inflammation: mechanistic insight from studies in mice. *Eur. Heart J.* **38**, 2838–2849.
- Yusipov I., Kondakova E., Kalyakulina A., Krivonosov M., Lobanova N., Bacalini M.G., Franceschi C., Vedunova M., Ivanchenko M. (2022) Accelerated epigenetic aging and inflammatory/immunological profile (ipAGE) in patients with chronic kidney disease. *Geroscience.* **44**, 817–834.
- Jalilnejad N., Rabiee M., Baheiraei N., Ghahremanzadeh R., Salarian R., Rabiee N., Akhavan O., Zarrintaj P., Hejna A., Saeb M.R., Zarrabi A., Sharifi E., Yousefiasl S., Zare E.N. (2023) Electrically conductive carbon-based (bio)-nanomaterials for cardiac tissue engineering. *Bioeng. Transl. Med.* **8**, 1–39.
- Wexler Y., Ghiringhelli M., Shaheen N., Glatstein S., Huber I., Edri O., Abboud Y., Landesberg M., Shiff D., Arbel G., Gepstein L. (2023) Chemogenetics for gene therapy based targeted cardiac electrophysiological modulation. *Circ. Res.* **132**, 645–647.
- Gilsbach R., Schwaderer M., Preissl S., Grüning B.A., Kranzhöfer D., Schneider P., Nührenberg T.G., Mulero-Navarro S., Weichenhan D., Braun C., Dreßen M., Jacobs A.R., Lahm H., Doenst T., Backofen R., Krane M., Gelb B.D., Hein L. (2018) Distinct epigenetic programs regulate cardiac myocyte development and disease in the human heart *in vivo*. *Nat. Commun.* **9**, 391.
- Zarzour A., Kim H.W., Weintraub N.L. (2019) Epigenetic regulation of vascular diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 984–990.
- Shi Y., Zhang H., Huang S., Yin L., Wang F., Luo P., Huang H. (2022) Epigenetic regulation in cardiovascular disease: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 200.
- Pepin M.E., Drakos S., Ha C.M., Tristani-Firouzi M., Selzman C.H., Fang J.C., Wende A.R., Wever-Pinzon O. (2019) DNA methylation reprograms cardiac metabolic gene expression in end-stage human heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **317**, H674–H684.
- Horvath S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* **14**, R115.
- Guarrera S., Fiorito G., Onland-Moret N.C., Russo A., Agnoli C., Allione A., Di Gaetano C., Mattiello A., Ricceri F., Chiodini P., Polidoro S., Frasca G., Verschuren M.W.M., Boer J.M.A., Iacoviello L., van der Schouw Y.T., Tumino R., Vineis P., Krogh V., Panico S., Sacerdote C., Matullo G. (2015) Gene-specific DNA methylation profiles and LINE-1 hypomethylation are associated with myocardial infarction risk. *Clin. Epigenetics.* **7**, 133.
- Nakatochi M., Ichihara S., Yamamoto K., Naruse K., Yokota S., Asano H., Matsubara T., Yokota M. (2017) Epigenome-wide association of myocardial infarction with DNA methylation sites at loci related to cardiovascular disease. *Clin. Epigenetics.* **9**, 54.
- Agha G., Mendelson M.M., Ward-Caviness C.K., Joehanes R., Huan T., Gondalia R., Salfati E., Brody J.A., Fiorito G., Bressler J., Chen B.H., Lighthart S., Guarrera S., Colicino E., Just A.C., Wahl S., Gieger C., Vandiver A.R., Tanaka T., Hernandez D.G., Pilling L.C., Singleton A.B., Sacerdote C., Krogh V., Panico S., Tumino R., Li Y., Zhang G., Stewart J.D., Floyd J.S., Wiggins K.L., Rotter J.I., Multhaup M., Bakulski K., Horvath S., Tsao P.S., Absher D.M., Vokonas P., Hirschhorn J., Fallin M.D., Liu C., Bandinelli S., Boerwinkle E., Dehghan A., Schwartz J.D., Psaty B.M., Feinberg A.P., Hou L., Ferrucci L., Sotoodehnia N., Matullo G., Peters A., Fornage M., Assimes T.L., Whitsel E.A., Levy D., Baccarelli A.A. (2019) Blood leukocyte DNA methylation predicts risk of future myocardial infarction and coronary heart disease. *Circulation.* **140**, 645–657.
- Aboyans V., Criqui M.H., Abraham P., Allison M.A., Creager M.A., Diehm C., Fowkes F.G.R., Hiatt W.R., Jönsson B., Lacroix P., Marin B., McDermott M.M., Norgren L., Pande R.L., Preux P.M., Stoffers H.E.J., Treat-Jacobson D., American Heart Association Council on Peripheral Vascular Disease, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. (2012) Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* **126**, 2890–2909.

16. Kondakova E.V., Ilina V.M., Ermakova L.M., Krivonosov M.I., Kuchin K.V., Vedunova M.V. (2023) New genetically determined markers of the functional state of the cardiovascular system. *Genes* (Basel). **14**, 185.
17. Pidsley R., Zotenko E., Peters T.J., Lawrence M.G., Risbridger G.P., Molloy P., Van Djik S., Muhlhautler B., Stirzaker C., Clark S.J. (2016) Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol.* **17**, 208.
18. Aryee M.J., Jaffe A.E., Corrada-Bravo H., Ladd-Acosta C., Feinberg A.P., Hansen K.D., Irizarry R.A. (2014) Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics.* **30**, 1363–1369.
19. Hannum G., Guinney J., Zhao L., Zhang L., Hughes G., Sada S., Klotzle B., Bibikova M., Fan J.-B., Gao Y., Deconde R., Chen M., Rajapakse I., Friend S., Ideker T., Zhang K. (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol. Cell.* **49**, 359–367.
20. Levine M.E., Lu A. T., Quach A., Chen B.H., Assimes T.L., Bandinelli S., Hou L., Baccarelli A.A., Stewart J.D., Li Y., Whitset E.A., Wilson J.G., Reiner A.P., Aviv A., Lohman K., Liu Y., Ferrucci L., Horvath S. (2018) An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging* (Albany NY). **10**, 573–591.
21. Lu A.T., Quach A., Wilson J.G., Reiner A.P., Aviv A., Raj K., Hou L., Baccarelli A.A., Li Y., Stewart J.D., Whitset E. A., Assimes T.L., Ferrucci L., Horvath S. (2019) DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging* (Albany NY). **11**, 303–327.
22. Courand P.Y., Grandjean A., Charles P., Paget V., Khettab F., Bricca G., Bousset L., Lantelme P., Harbaoui B. (2015) R wave in aVL lead is a robust index of left ventricular hypertrophy: a cardiac MRI study. *Am. J. Hypertens.* **28**, 1038–1048.
23. Cecelja M., Chowienzyk P. (2010) Arterial stiffening: cause and prevention. *Hypertension.* **56**, 29–30.
24. Davydova E., Perenkov A., Vedunova M. (2024) Building minimized epigenetic clock by iPlex MassARRAY platform. *Genes* (Basel). **15**, 425.
25. Simonson E., Nakagawa K. (1960) Effect of age on pulse wave velocity and “aortic ejection time” in healthy men and in men with coronary artery disease. *Circulation.* **22**, 126–129.
26. Gozna E.R., Marble A.E., Shaw A., Holland J.G. (1974) Age-related changes in the mechanics of the aorta and pulmonary artery of man. *J. Appl. Physiol.* **36**, 407–411.
27. Avolio A.P., Chen S.G., Wang R.P., Zhang C.L., Li M.F., O’Rourke M.F. (1983) Effects of aging on changing arterial compliance and left ventricular load in a northern Chinese urban community. *Circulation.* **68**, 50–58.
28. Vaitkevicius P.V., Fleg J.L., Engel J.H., O’Connor F.C., Wright J.G., Lakatta L.E., Yin F.C., Lakatta E.G. (1993) Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation.* **88**, 1456–1462.
29. McEnery C.M., Yasmin, Hall I.R., Qasem A., Wilkinson I.B., Cockcroft J.R.; ACCT Investigators. (2005) Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1753–1760.
30. Chen Y., Sun G., Guo X., Li Z., Li G., Zhou Y., Yang H., Yu S., Zheng L., Sun Y. (2021) Performance of a novel ECG criterion for improving detection of left ventricular hypertrophy: a cross-sectional study in a general Chinese population. *BMJ Open.* **11**, e051172.
31. Rautaharju P.M., Zhou S.H., Calhoun H.P. (1994) Ethnic differences in ECG amplitudes in North American white, black, and Hispanic men and women: effect of obesity and age. *J. Electrocardiol.* **27**, 20–31.
32. Wu J., Kors J.A., Rijnbeek P.R., van Herpen G., Lu Z., Xu C. (2003) Normal limits of the electrocardiogram in Chinese subjects. *Int. J. Cardiol.* **87**, 37–51.
33. Cronjé H.T., Elliott H.R., Nienaber-Rousseau C., Green F.R., Schutte A.E., Pieters M. (2020) Methylation vs. protein inflammatory biomarkers and their associations with cardiovascular function. *Front. Immunol.* **11**, 1577.
34. Nascimento L.V., Neto F.L., Ribeiro Moreira D.A., Cerutti V.B., Thurow H.S., Bastos G.M., Ferreira E.B., Crespo Hirata R.D., Hirata M.H. (2022) Influence of antidepressant drugs on DNA methylation of ion channels genes in blood cells of psychiatric patients. *Epigenomics.* **14**, 851–864.
35. Cho K.I., Shin E.S., Ann S.H., Garg S., Her A.Y., Kim J.S., Han J.H., Jeong M.H., KAMIR Registry. (2016) Gender differences in risk factors and clinical outcomes in young patients with acute myocardial infarction. *J. Epidemiol. Community Health.* **70**, 1057–1064.
36. Schultz W.M., Kelli H.M., Lisko J.C., Varghese T., Shen J., Sandesara P., Quyyumi A.A., Taylor H.A., Gulati M., Harold J.G., Mieres J.H., Ferdinand K.C., Mensah G.A., Sperling L. S. (2018) Socioeconomic status and cardiovascular outcomes: challenges and interventions. *Circulation.* **137**, 2166–2178.
37. Niakouei A., Tehrani M., Fulton L. (2020) Health disparities and cardiovascular disease. *Healthcare* (Basel). **8**, 65.
38. Wang P., Yao J., Xie Y., Luo M. (2020) Gender-specific predictive markers of poor prognosis for patients with acute myocardial infarction during a 6-month follow-up. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **13**, 27–38.
39. St. Pierre S.R., Peirlinck M., Kuhl E. (2022) Sex matters: a comprehensive comparison of female and male hearts. *Front. Physiol.* **13**, 831179.
40. Soler-Botija C., Gálvez-Montón C., Bayés-Genís A. (2019) Epigenetic biomarkers in cardiovascular diseases. *Front. Genetics.* **10**, 950.
41. Nova-Lampeti E., Aguilera V., Oporto K., Guzmán P., Ormazábal V., Zúñiga F., Escudero C., Aguayo C. (2018) Hox genes in adult tissues and their role in endothelial cell differentiation and angiogenesis. In: *Endothelial Dysfunction – Old Concepts and New Challenges*. Ed. Lenasi H. Intech. <https://www.intechopen.com/books/6209>

42. Zaina S., Heyn H., Carmona F.J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramírez-Ruz J., Gomez A., Gonçalves I., Moran S., Esteller M. (2014) DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **7**, 692–700.
43. Shafi O. (2020) Switching of vascular cells towards atherogenesis, and other factors contributing to atherosclerosis: a systematic review. *Thromb. J.* **18**, 28.
44. Roux M., Zaffran S. (2016) Hox genes in cardiovascular development and diseases. *J. Dev. Biol.* **4**, 14.
45. Nazarenko M.S., Markov A.V., Lebedev I.N., Freidin M.B., Sleptcov A.A., Koroleva I.A., Frolov A.V., Popov V.A., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. (2015) A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease. *PLoS One.* **10**, e0122601.
46. Krolevets M., Cate V.T., Prochaska J.H., Schulz A., Rapp S., Tenzer S., Andrade-Navarro M.A., Horvath S., Niehrs C., Wild P.S. (2023) DNA methylation and cardiovascular disease in humans: a systematic review and database of known CpG methylation sites. *Clin. Epigenetics.* **15**, 56.
47. Lee M.Y., Luciano A.K., Ackah E., Rodriguez-Vita J., Bancroft T.A., Eichmann A., Simons M., Kyriakides T.R., Morales-Ruiz M., Sessa W.C. (2014) Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 12865–12870.
48. Lee M.Y., Gamez-Mendez A., Zhang J., Zhuang Z., Vinyard D.J., Kraehling J., Velazquez H., Brudvig G.W., Kyriakides T.R., Simons M., Sessa W.C. (2018) Endothelial cell autonomous role of Akt1: regulation of vascular tone and ischemia-induced arteriogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 870–879.
49. Fernández-Hernando C., Ackah E., Yu J., Suárez Y., Murata T., Iwakiri Y., Prendergast J., Miao R.Q., Birnbaum M.J., Sessa W.C. (2007) Loss of Akt1 leads to severe atherosclerosis and occlusive coronary artery disease. *Cell Metab.* **6**, 446–457.
50. Wu J., Gale C.P., Hall M., Dondo T.B., Metcalfe E., Oliver G., Batin P.D., Hemingway H., Timmis A., West R.M. (2018) Editor's Choice – Impact of initial hospital diagnosis on mortality for acute myocardial infarction: a national cohort study. *Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care.* **7**, 139–148.
51. Qiu L., Liu X. (2019) Identification of key genes involved in myocardial infarction. *Eur. J. Med. Res.* **24**, 22.
52. Li M., Chen F., Zhang Y., Xiong Y., Li Q., Huang H. (2020) Identification of post-myocardial infarction blood expression signatures using multiple feature selection strategies. *Front Physiol.* **11**, 483.
53. Lambert M., Capuano V., Olschewski A., Sabourin J., Nagaraj C., Girerd B., Weatherald J., Humbert M., Antigny F. (2018) Ion channels in pulmonary hypertension: a therapeutic interest? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3162.
54. He L., Beghi F., Baral V., Dépond M., Zhang Y., Joulin V., Rueda B.R., Gonin P., Foudi A., Wittner M., Louache F. (2019) CABLES1 deficiency impairs quiescence and stress responses of hematopoietic stem cells in intrinsic and extrinsic manners. *Stem. Cell Rep.* **13**, 274–290.
55. Bacos K., Gillberg L., Volkov P., Olsson A. H., Hansen T., Pedersen O., Gjesing A.P., Eiberg H., Tuomi T., Almgren P., Groop L., Eliasson L., Vaag A., Dayeh T., Ling C. (2016) Blood-based biomarkers of age-associated epigenetic changes in human islets associate with insulin secretion and diabetes. *Nat. Commun.* **7**, 11089.
56. Liu W.B., Han F., Jiang X., Yin L., Chen H.Q., Li Y.H., Liu Y., Cao J., Liu J.Y. (2015) Epigenetic regulation of ANKRD18B in lung cancer. *Mol. Carcinog.* **54**, 312–321.
57. Huang Z., Jing H., Lv J., Chen Y., Huang Y., Sun S. (2023) Investigating doxorubicin's mechanism of action in cervical cancer: a convergence of transcriptomic and metabolomic perspectives. *Front. Genet.* **14**, 1234263.
58. Pu Z., Wang Y., Liu X., Liu J., Cui J., Wang Y., Lv B., Yu B. (2017) Cables1 inhibits proliferation and induces senescence by angiotensin II via a p21-dependent pathway in human umbilical vein endothelial cells. *J. Vasc. Res.* **54**, 13–21.
59. Zhai D., Li S., Zhao Y., Lin Z. (2014) SLC6A3 is a risk factor for Parkinson's disease: a meta-analysis of sixteen years' studies. *Neurosci. Lett.* **564**, 99–104.
60. Reith M.E.A., Kortagere S., Wiers C.E., Sun H., Kurian M.A., Galli A., Volkow N.D., Lin Z. (2022) The dopamine transporter gene SLC6A3: multidisease risks. *Mol. Psychiatry.* **27**, 1031–1046.
61. Bou Sleiman M., Jha P., Houtkooper R., Williams R.W., Wang X., Auwerx J. (2020) The gene-regulatory footprint of aging highlights conserved central regulators. *Cell Rep.* **32**, 108203.
62. Gimeno-Valiente F., Riffo-Campos Á. L., Vallet-Sánchez A., Siscar-Lewin S., Gambardella V., Tarazona N., Cervantes A., Franco L., Castillo J., López-Rodas G. (2019) ZNF518B gene up-regulation promotes dissemination of tumour cells and is governed by epigenetic mechanisms in colorectal cancer. *Sci. Rep.* **9**, 9339.
63. Saiedullah M., Rahman M., Siddique M.A.H. (2016) Atherogenic index and female gender are independent determinants of chronic subclinical inflammation in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Case Rep.* **1**, 115.
64. Zong J., Salim M., Zhou H., Bian Z., Dai J., Yuan Y., Deng W., Zhang J., Zhang R., Wu Q., Tang Q. (2013) NOD2 deletion promotes cardiac hypertrophy and fibrosis induced by pressure overload. *Lab. Invest.* **93**, 1128–1136.
65. Huang T., Shu Y., Cai Y.D. (2015) Genetic differences among ethnic groups. *BMC Genomics.* **16**, 1093.
66. Galluzzo S., Patti G., Dicuonzo G., Di Sciascio G., Tonini G., Ferraro E., Spoto C., Campanale R., Zoccoli A., Angeletti S. (2011) Association between NOD2/CARD15 polymorphisms and coronary artery disease: a case-control study. *Hum. Immunol.* **72**, 636–640.
67. Kamperidis N., Kamperidis V., Zegkos T., Kostourou I., Nikolaidou O., Arebi N., Karvounis H. (2021) Atherosclerosis and inflammatory bowel disease-

- shared pathogenesis and implications for treatment. *Angiology*. **72**, 303–314.
68. D'Amico A., Graziano C., Pacileo G., Petrini S., Nowak K.J., Boldrini R., Jacques A., Feng J.J., Porfirio B., Sewry C.A., Santorelli F.M., Limongelli G., Bertini E., Laing N., Marston S.B. (2006) Fatal hypertrophic cardiomyopathy and nemaline myopathy associated with ACTA1 K336E mutation. *Neuromuscul. Disord.* **16**, 548–552.
69. Kiselev I., Danilova L., Baulina N., Baturina O., Kabilov M., Boyko A., Kulakova O., Favorova O. (2022) Genome-wide DNA methylation profiling identifies epigenetic changes in CD4⁺ and CD14⁺ cells of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **60**, 103714.
70. Yoshioka N., Kurose M., Yano M., Tran D.M., Okuda S., Mori-Ochiai Y., Horie M., Nagai T., Nishino I., Shibata S., Takebayashi H. (2022) Isoform-specific mutation in Dystonin-b gene causes late-onset protein aggregate myopathy and cardiomyopathy. *Elife*. **11**, e78419.
71. Miksiunas R., Mobasher A., Bironaite D. (2020) Homeobox genes and homeodomain proteins: new insights into cardiac development, degeneration and regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1212**, 155–178.
72. Mongelli A., Panunzi S., Nesta M., Zamperla M.G., Atlante S., Barbi V., Mongiardini V., Ferraro F., Martino S.D., Cis L., Re A., Maltese S., Bachetti T., Rovere M.T.L., Martelli F., Pesce M., Nanni S., Massetti M., Pontecorvi A., Farsetti A., Gaetano C. (2023) Distinguishable DNA methylation defines a cardiac-specific epigenetic clock. *Clin. Epigenetics*. **15**(1), 53.
73. Lindow T., Palencia-Lamela I., Schlegel T.T., Ugander M. (2022) Heart age estimated using explainable advanced electrocardiography. *Sci. Rep.* **12**, 9840.
74. Ball R.L., Feiveson A.H., Schlegel T.T., Starc V., Dabney A.R. (2014) Predicting “heart age” using electrocardiography. *J. Pers. Med.* **4**(1), 65–78.
75. Ribeiro A.H., Ribeiro M.H., Paixão G.M.M., Oliveira D.M., Gomes P.R., Canazart J.A., Ferreira M.P.S., Andersson C.R., Macfarlane P. W., Wagner M.Jr., Schön T.B., Ribeiro A.L.P. (2020) Automatic diagnosis of the 12-lead ECG using a deep neural network. *Nat. Commun.* **11**(1), 1760.
76. Topriceanu C.C., Dev E., Ahmad M., Hughes R., Shiwani H., Webber M., Direk K., Wong A., Ugander M., Moon J. C., Hughes A. D., Maddock J., Schlegel T. T., Captur G. (2023) Accelerated DNA methylation age plays a role in the impact of cardiovascular risk factors on the human heart. *Clin. Epigenetics*. **15**, 164.

New Epigenetic Markers Of Age-Dependent Changes In The Cardiovascular System

L. M. Ermakova¹, E. A. Davydova^{1, *}, E. V. Kondakova¹,
K. V. Kuchin², M. V. Vedunova¹

¹*Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603022 Russia*

²*Clinical Hospital No. 38, Nizhny Novgorod, 603000 Russia*

*e-mail: spring_dusk@mail.ru

Cardiovascular diseases remain a predominant global cause of mortality, with a noteworthy rise in the risk of morbidity with advancing age. Besides, it accompanied by a phenomenon of disease rejuvenation in the circulatory system. Currently, epigenetic modifications play a key role in the genesis of cardiovascular diseases (CVD), influencing the complex interaction between genotype and phenotype variability. Consequently, delving into the realm of epigenetic markers offers a promising avenue to unravel the molecular underpinnings of cardiovascular disease pathogenesis. This study endeavors to pinpoint epigenetic markers intricately linked with age-related transformations in the cardiovascular system. The study revealed a robust correlation with age for two cardiological parameters: R wave tension in the augmented left arm lead (RaVL) and carotid-femoral pulse wave velocity (cfPWV). Moreover, these parameters exhibited a strong correlation with the DNA methylation level of 21 CpG-sites (CpGs) examined through the Illumina EPIC array. Notably, the majority of these identified CpG-sites are affiliated with genes involved in the development of pathologies of the cardiovascular system.

Keywords: aging, biological age, chronological age, coronary vascular diseases, CpGs, DNA methylation, electrocardiogram, sphygmography

УДК 577.25

ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *TRIM* В НЕЙРОНАЛЬНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА В НОРМЕ И ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ

© 2024 г. В. В. Ненашева^а, Е. В. Новосадова^а, Т. П. Герасимова^б,
Л. В. Новосадова^а, А. Ю. Коток^а, Е. Л. Арсеньева^а, Е. А. Степаненко^{а, *},
И. А. Гривенников^а, В. З. Тарантул^а

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

^бФедеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства,
Москва, 119435 Россия

*e-mail: katishsha@mail.ru

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

После доработки 06.06.2024 г.

Принята к публикации 11.06.2024 г.

Белки семейства *TRIM* принимают участие как в процессах врожденного иммунитета, так и в работе нервной системы и могут играть важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. В представленной работе анализировали экспрессию 35 генов семейства *TRIM* в нейральных предшественниках, терминально дифференцированных нейронах и глиальных производных, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток здоровых доноров и пациентов с болезнью Паркинсона, в условиях отсутствия воспалительных стимулов и при индукции неспецифического воспалительного ответа под воздействием TNF α . Экспрессия лишь небольшого числа генов *TRIM* в нейральных предшественниках и терминально дифференцированных нейронах пациентов с болезнью Паркинсона, отличалась от экспрессии в клетках здоровых доноров. Под влиянием TNF α в терминально дифференцированных нейронах активировалась экспрессия отдельных генов *TRIM*, более существенная в клетках пациентов с болезнью Паркинсона в сравнении с клетками здоровых доноров. В глиальных производных пациентов с болезнью Паркинсона экспрессия многих генов *TRIM* была изначально ниже, чем в клетках здоровых доноров, и оставалась низкой или дополнительно снижалась после воздействия TNF α . Полученные данные демонстрируют различия в вовлеченности ряда генов мультигенного семейства *TRIM* в процессы, протекающие при болезни Паркинсона в нейронах и в глии, а также показывают разнонаправленное влияние воспалительного стимула на экспрессию целого ряда генов *TRIM* в этих трех типах клеток. Учитывая важную роль многих генов *TRIM* в работе врожденной иммунной системы, можно предположить, что при болезни Паркинсона в глии происходят более значительные нарушения в работе генов этого семейства по сравнению с нейронами.

Ключевые слова: гены семейства *TRIM*, дифференциальная экспрессия, болезнь Паркинсона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, нейральные предшественники, нейроны, глия, индукция воспалительного ответа

DOI: 10.31857/S0026898424060172, EDN: HZSRSN

ВВЕДЕНИЕ

Нейроиммунология исследует взаимосвязь между иммунной и нервной системами. Эти системы совместно поддерживают гомеостаз в организме человека, нарушение которого может

приводить к различным патологиям. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что изменения в работе системах врожденного иммунитета, в частности в системе воспалительного ответа, могут приводить к возникновению ней-

Сокращения: *TRIM* – TRIPartite Motif; БП – болезнь Паркинсона; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; НП – нейральные предшественники; ТДН – терминально дифференцированные нейроны; НГ – нейроглиальные культуры.

родегенеративных и психических заболеваний [1, 2]. Накоплены данные, свидетельствующие о важной роли нейровоспаления в патогенезе болезни Паркинсона (БП) и других нейродегенеративных патологий [3–5]. При нейродегенеративных заболеваниях наблюдается гибель определенных групп нейронов в головном мозге, и воспаление может в значительной степени способствовать этому процессу.

Семейство белков TRIM (TRIPartite Motif) принимает активное участие в работе как врожденного иммунитета [6, 7], так и нервной системы [8]. По этой причине белки TRIM могут играть существенную роль во взаимодействии этих двух систем. В семейство TRIM входят порядка 80 белков, объединенных по принципу общей структуры, включающей RING-домен, отвечающий за свойство E3-убиквитинлигазы, один или два цинк-содержащих B-box-домена, CС-домен и набор различных C-концевых доменов, вовлеченных в белок-белковые взаимодействия [9].

Белки TRIM участвуют в передаче сигнала от рецепторов врожденного иммунитета к транскрипционным факторам при иммунном ответе на вирусные и бактериальные инфекции [7, 10, 11], а также в регуляции воспалительного ответа [12]. Белки TRIM участвуют и в других процессах, в частности, в апоптозе, аутофагии, дифференцировке и росте клеток, а также в онкогенезе [13, 14].

Показано, что некоторые белки TRIM вовлечены в развитие патологических процессов, приводящих к дегенерации и гибели нейронов в определенных отделах ЦНС и связанных с иммунной и нервной системами, например, при болезни Альцгеймера [15–17], БП [18–22] и болезни Хантингтона [23, 24]. Молекулярно-генетические механизмы работы белков TRIM в иммунной и нервной системах очень разнообразны и остаются не до конца изученными.

Клеточные линии на основе производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека, которые могут быть получены путем репрограммирования соматических клеток, признаны перспективной платформой для исследования функционирования клеток головного мозга человека *in vitro* и моделирования нейродегенеративных заболеваний ЦНС. С использованием ИПСК можно получать клетки разной специализации с сохранением индивидуального генотипа донора, а также обходить трудности, связанные с малой доступностью биопсийного материала мозга человека и сложностью культивирования взрослых нейронов *in vitro* [25, 26].

В настоящей работе нами проанализированы уровни экспрессии ряда генов семейства *TRIM*, отобранных на основании опубликованных дан-

ных, в нейрональных и глиальных производных ИПСК здоровых доноров и пациентов с семейными формами БП. Также сравнили уровни экспрессии этих генов при активации воспалительного ответа в линиях клеток с использованием TNF α . Полученные данные позволили выявить гены семейства *TRIM*, наиболее перспективные для дальнейшего изучения в контексте их влияния на нейровоспаление при БП в нейронах и глиии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение дифференцированных производных ИПСК. Полученные ранее ИПСК здоровых доноров и ИПСК БП (табл. S1, см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Nenasheva_rus.pdf) были дифференцированы в нейральные предшественники (НП), как описано ранее Новосадовой и соавт. [27]. Морфологическую и молекулярно-генетическую оценку популяции клеток проводили на 1–2 пассаже (рис. S1a, S2a, см. электронное приложение). Для получения культур терминально дифференцированных нейронов (ТДН), преимущественно дофаминергических, НП дифференцировали по ранее описанной методике [27]. На 15-е сутки культивирования нейронов в дифференцировочной среде часть клеток фиксировали параформальдегидом для иммуноцитохимического окрашивания (рис. S1б, S2б) и часть использовали для выделения РНК и белка. Нейроглиальные культуры (НГ) получены по методике, описанной ранее Новосадовой и соавт. [28]. Часть клеток фиксировали параформальдегидом для иммуноцитохимического окрашивания (рис. S1в, S2в), а часть отбирали для дальнейшего анализа в них РНК и белков.

Индукция воспаления с помощью TNF α . Индукцию воспалительных процессов в НГ и ТДН осуществляли согласно Герасимовой и соавт. [29] и Subramanian и соавт. [30], соответственно.

Выделение РНК и получение кДНК. Суммарную клеточную РНК экстрагировали из клеток с помощью набора реактивов для очистки РНК (ExtractRNA, “Евроген”, Россия), как рекомендовано производителем, с последующей обработкой ДНКазой (“ThermoFisherScientific”, США). кДНК синтезировали на 2 мкг суммарной РНК с использованием обратной транскриптазы M-MLV (“Евроген”) со случайными праймерами.

Количественная ПЦР в режиме реального времени. Полученную кДНК амплифицировали с использованием системы LightCycler 96 (“Roche”, Швейцария/Германия) и реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”). Условия реакции: денатурация при 95°C (3 мин), затем 40 циклов (95°C, 15 с; 60–65°C, 20 с; и 72°C, 45 с). Уровень мРНК целевых генов оценивали с использовани-

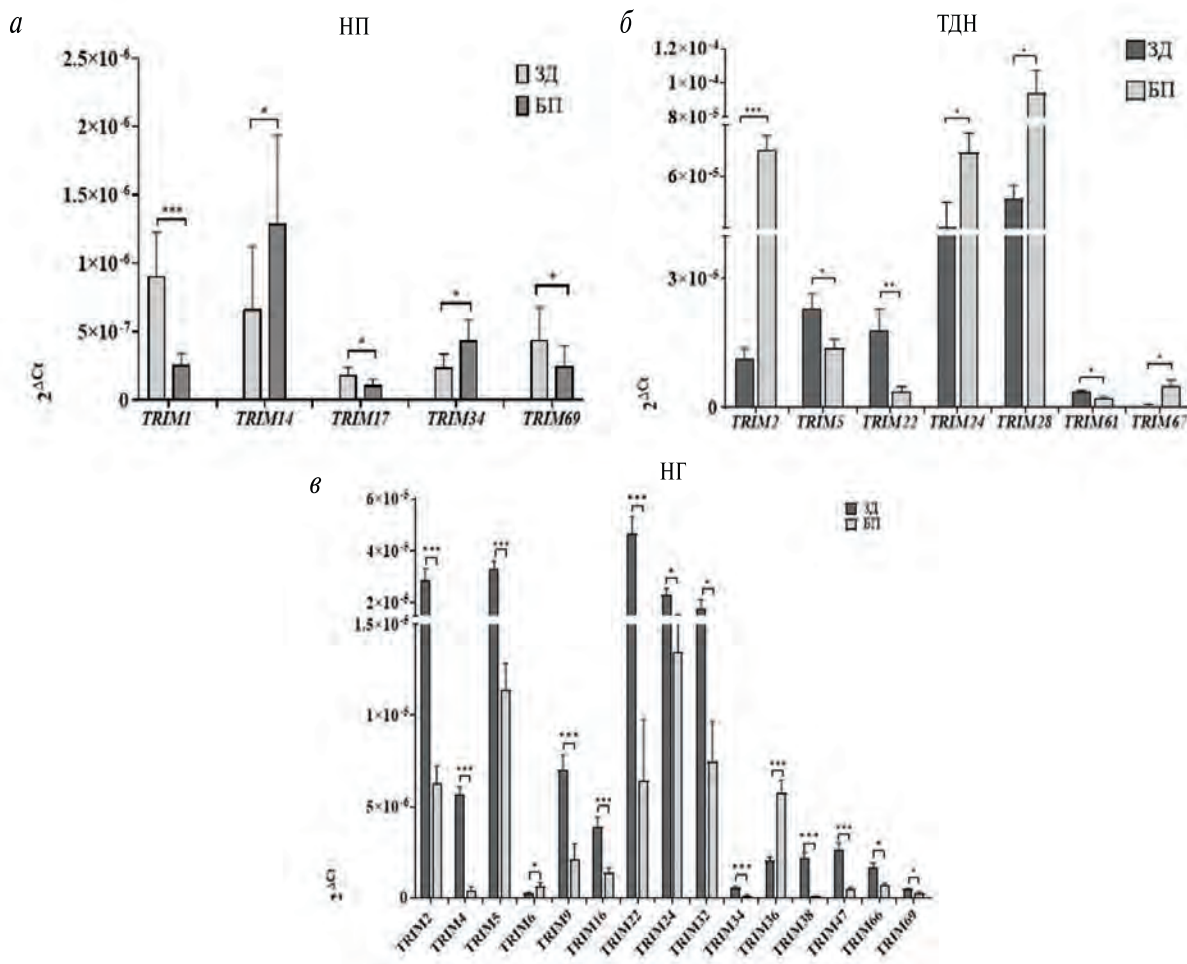


Рис. 1. ПЦР-анализ экспрессии генов семейства *TRIM* в НП (а), ТДН (б) и НГ (в) здоровых доноров (ЗД) и пациентов с БП (БП). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. В качестве референсного гена использовали ген 18S рРНК.

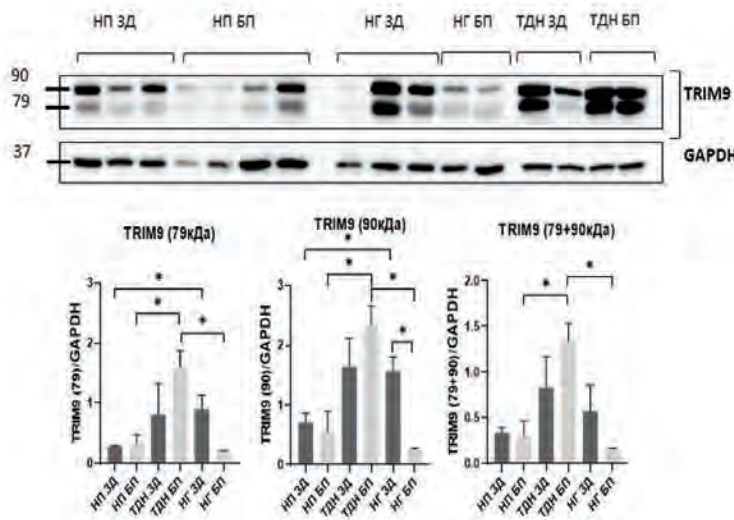
ем сравнительного метода $2^{-\Delta Ct}$ [31] не менее чем в трех повторностях для каждой точки. Для нормализации использовали ген 18S рРНК. Последовательности использованных праймеров приведены в работе Степаненко и соавт. [11].

Вестерн-блот-гибридизация. Для лизиса клеток и тканей использовали буфер RIPA, содержащий смесь ингибиторов протеаз (“Sigma-Aldrich”, США). Концентрацию общего белка в образцах определяли колориметрическим методом с использованием бицинониновой кислоты. Равное количество белка (20 мкг на образец) разделяли электрофоретически в 12–15%-ном денатурирующем (SDS) полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембрану для блотинга белков (“Bio-Rad”, США). Мембраны блокировали в 5%-ном обезжиренном молоке и инкубировали в 1%-ном молоке с первичными антителами к TRIM9 (1 : 250; SC515007, “SantaCruz”, США) и антителами

к GAPDH (1 : 3000; AF7021, “Affinity”, США) при 4– в течение ночи, промывали 5 раз по 5 мин раствором TBST и инкубировали в 1%-ном молоке со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1 : 10000; 31466, “Invitrogen”, США или 1 : 7500; 140777, “Jackson ImmunoResearch”, Великобритания) при комнатной температуре в течение 2 ч. Сигнал регистрировали с помощью ClarityMaxWestern ECL Substrate (“Bio-Rad”) с использованием системы ChemiDoc MP ImagingSystem (“Bio-Rad”).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 8.0. Для выявления различий в экспрессии генов (по результатам ПЦР) и белков (по результатам вестерн-блот-гибридизации) между линиями использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Нормальность распределения данных проверяли при помощи теста Шапиро–Уилкоксона. Данные,

а



б

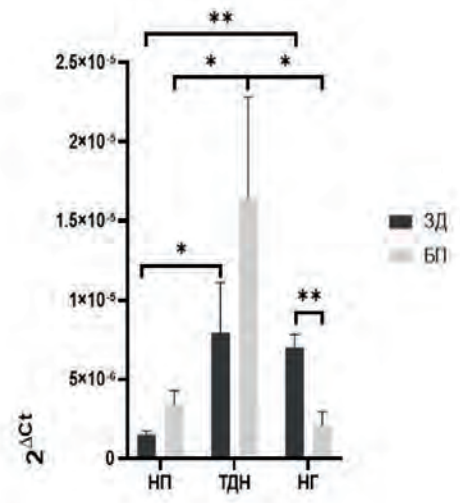


Рис. 2. Анализ уровня белка (а) и мРНК (б) гена *TRIM9* в НП, ТДН и НГ здоровых доноров и пациентов с болезнью Паркинсона (БП). Референсный белок — GAPDH.

распределение которых отличалось от нормального, приводили к нормальному распределению с использованием преобразования Бокса–Кокса. Парные множественные сравнения экспрессии генов в линиях клеток от здоровых доноров и пациентов с БП проводили с использованием апостериорных критериев, в частности критерия Тьюки. Различия с $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ дифференциальной транскрипции и трансляции генов *TRIM* при болезни Паркинсона

С помощью ПЦР в режиме реального времени в клетках трех здоровых доноров и четырех пациентов с БП на разных этапах нейрональной дифференцировки ИПСК оценили относительный уровень экспрессии 35 генов *TRIM*, относящихся к разным подгруппам этого семейства [32]. Были отобраны гены *TRIM*, которые, согласно результатам анализа транскриптомов, дифференциально экспрессировались в НП и ТДН пациентов с БП и в клетках здоровых доноров [27], а также гены, нарушения в работе которых наблюдались при нейровоспалении и нейродегенеративных заболеваниях.

Следует отметить, что паттерны экспрессии генов *TRIM* в целом схожи как в НП, так и в ТДН, а также в НГ здоровых доноров и пациентов с БП: высокий уровень экспрессии характерен для генов *TRIM18*, *24*, *27* и *28* (рис. S3, см. электронное при-

ложение). При этом в НП, полученных из ИПСК от пациентов с БП, наблюдалось статистически значимое по сравнению с контролем снижение уровня экспрессии генов *TRIM1*, *17* и *69* и увеличение экспрессии генов *TRIM14* и *34* (рис. 1а).

В ТДН от пациентов с БП по сравнению с контролем был повышен уровень экспрессии генов *TRIM2*, *24*, *28* и *67* и снижен *TRIM5*, *22* и *61* (рис. 1б). Таким образом, в нейрональных клетках, полученных от пациентов с БП, в ходе дифференцировки изменяется спектр дифференциально экспрессирующихся генов.

Более значительные изменения в экспрессии генов *TRIM* при БП происходили в НГ. Экспрессия генов *TRIM6* и *36* при БП была выше, чем в контроле, тогда как экспрессия генов *TRIM2*, *4*, *5*, *9*, *16*, *22*, *24*, *32*, *34*, *38*, *47*, *66* и *69* была статистически значимо снижена (рис. 1в).

На следующем этапе проведен анализ экспрессии гена *TRIM9* на уровне белка в НП, ТДН и НГ, полученных от здоровых доноров и от пациентов с БП. Ген *TRIM9*, специфично экспрессирующийся в мозге [18], способен регулировать нейровоспаление, блокируя опосредованную NF-κB активацию воспалительного ответа [33, 34]. Показано, что уровень белка TRIM9 снижается в пораженных участках мозга при БП и деменции с тельцами Леви [18].

По нашим данным, во всех исследованных нами типах клеток белок TRIM9 представлен двумя изоформами — 79 и 90 кДа (что соответствует базе данных Uniprot) (рис. 2а). При этом наблюдалось увеличение количества обеих

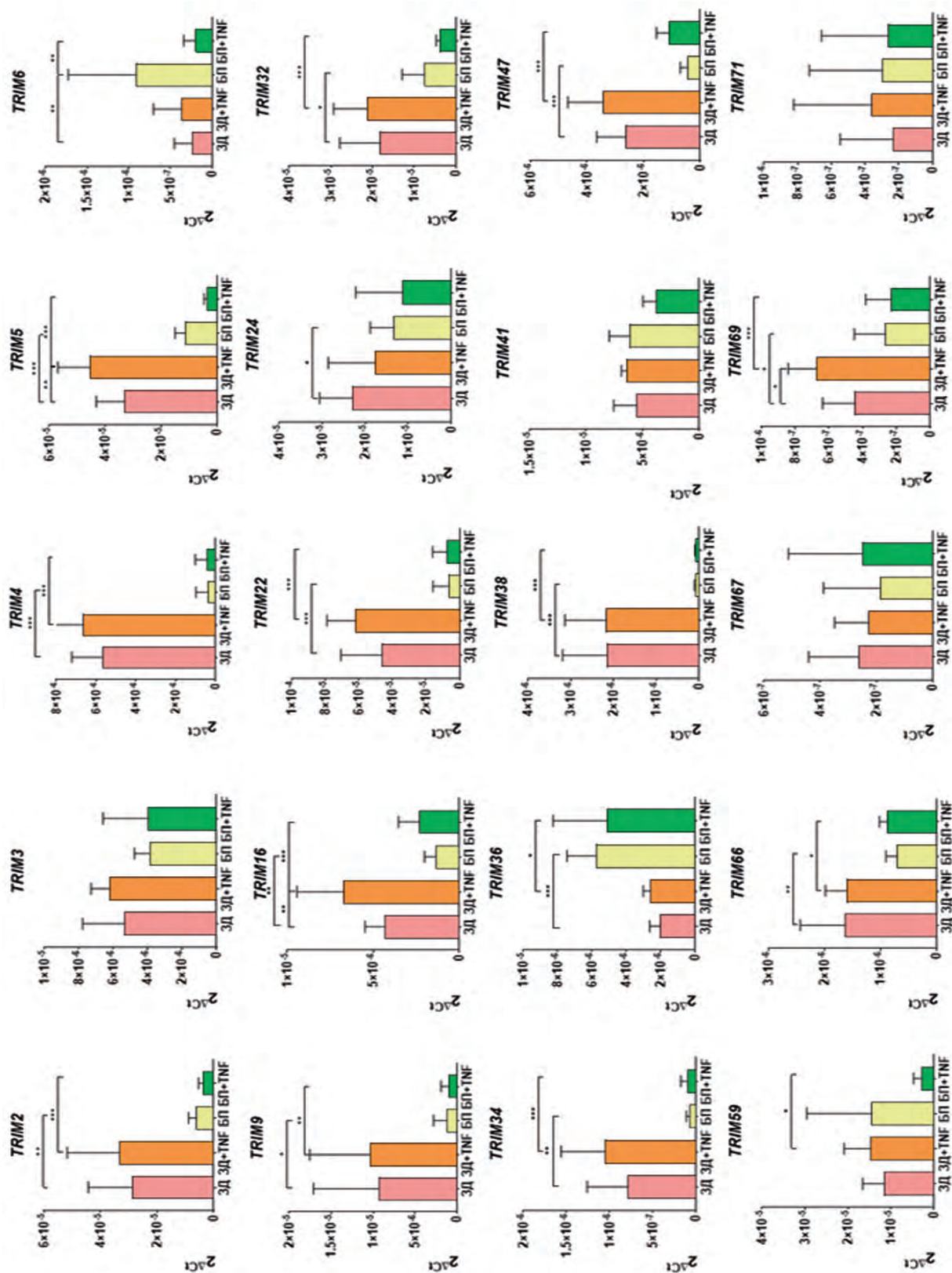


Рис. 3. ПЦР-анализ экспрессии генов *TRIM* в НГ, полученных от пациентов с БП и здоровых доноров, в норме и через 24 ч после стимуляции воспаления $TNF\alpha$ (10 нг/мл). В качестве референсного гена использовали ген 18S рРНК. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

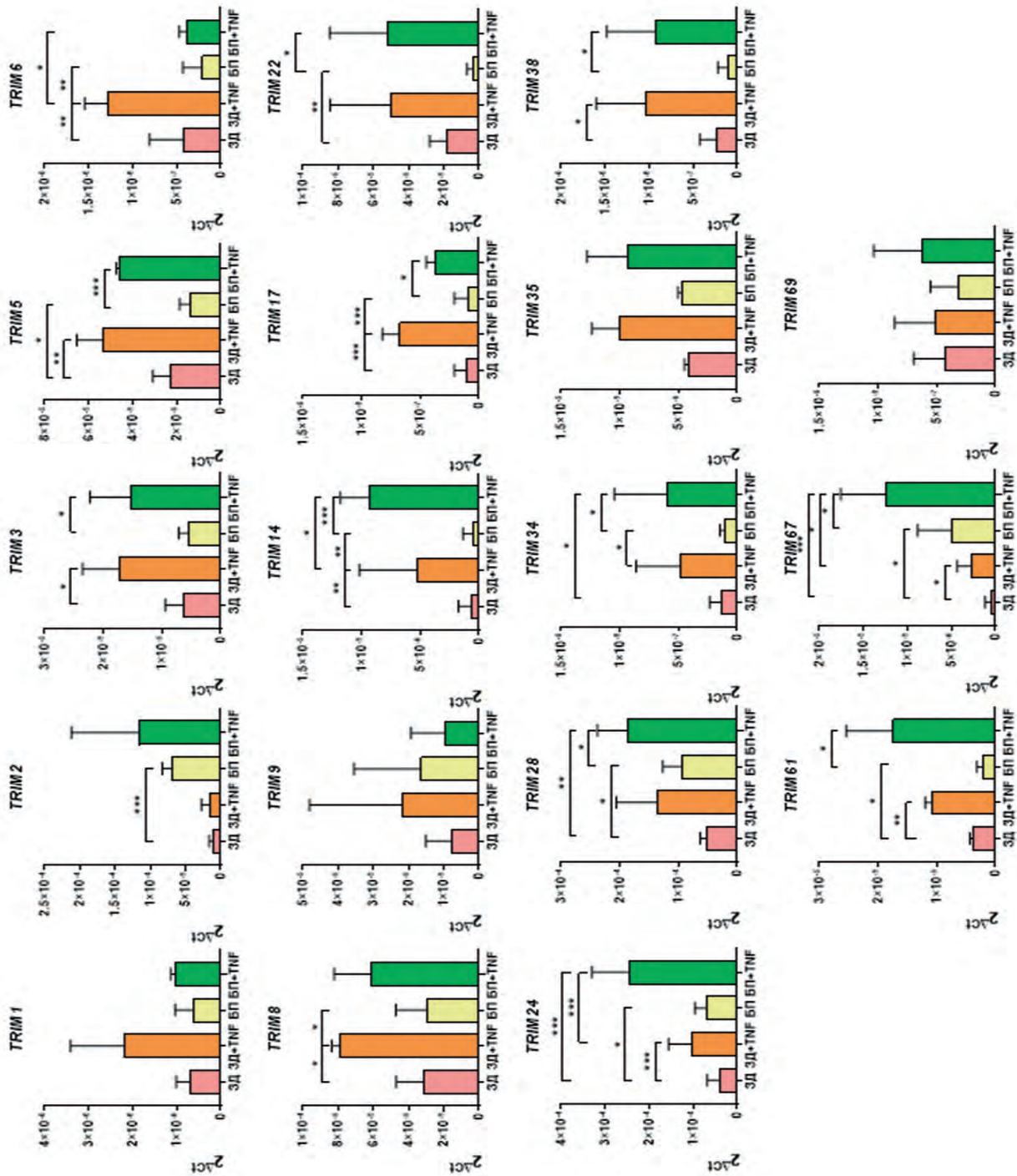


Рис. 4. ПЦР-анализ экспрессии генов *TRIM* в ТДМ пациентов с БП и здоровых доноров, в норме и через 24 ч после стимуляции воспаления $TNF\alpha$ (20 нг/мл). Референсный ген 18S рРНК. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

изоформ этого белка в ТДН пациентов с БП по сравнению с НП и НГ, что в целом согласуется с результатами анализа транскрипции гена *TRIM9* (рис. 2б). В ТДН пациентов с БП наблюдается тенденция к увеличению экспрессии гена и белка *TRIM9* по сравнению с контролем, в то время как в НГ пациентов с БП, напротив, уровень мРНК и белка *TRIM9* снижался.

Анализ влияния воспаления на дифференциальную экспрессию генов TRIM в клетках здоровых доноров и пациентов с болезнью Паркинсона

В патогенезе БП и других заболеваний, связанных с нейродегенеративными процессами в тканях мозга, важную роль играет нейровоспаление, которое характеризуется хронической активацией микроглии, усиленной продукцией провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6 и др.), активацией астроцитов и гибелью нейронов [3, 5, 35].

Воздействие TNF α в концентрации 10 нг/мл на НГ приводило к существенному усилению экспрессии генов провоспалительных цитокинов — *TNFA*, *IL6* и *IL1B* [29], что свидетельствует о том, что данная концентрация TNF α достаточна для индукции воспалительного ответа. В недавнем исследовании Subramanian и соавт. для стимуляции клеток нейробластомы использовали TNF α в более высокой концентрации — 20 нг/мл [30]. Учитывая эти данные, в качестве условий для индукции неспецифичной воспалительной реакции в НГ мы выбрали концентрацию 10 нг/мл, для стимуляции ТДН — 20 нг/мл, время экспозиции обоих типов клеток — 24 ч.

Далее был проведен анализ экспрессии генов *TRIM* в НГ здоровых доноров и пациентов с БП после стимуляции воспаления с помощью TNF α (рис. 3). Под влиянием TNF α экспрессия большинства исследованных генов семейства *TRIM* оставалась значительно ниже в НГ пациентов с БП, в то время как в клетках здоровых доноров наблюдалось повышение экспрессии части генов. Обнаружено, что экспрессия генов *TRIM5*, *6*, *32* и *59* увеличивалась или не изменялась после обработки TNF α культур клеток здоровых доноров, однако в клетках от пациентов с БП происходило резкое дополнительное подавление экспрессии этих генов (рис. 3). Это может указывать как на снижение иммунного ответа в глии у пациентов с БП, так и на ее меньшую способность к активации TNF α .

В отличие от глиальных клеток, в ТДН как здоровых доноров, так и пациентов с БП после воздействия TNF α наблюдался рост экспрессии многих генов *TRIM*. Спектр большинства исследованных генов *TRIM*, экспрессия которых повышалась под воздействием TNF α , был одинаковым в клетках

здоровых доноров и пациентов с БП — это гены *TRIM3*, *5*, *8*, *14*, *17*, *22*, *24*, *28*, *34*, *38*, *61* и *67* (рис. 4). Кроме того, в клетках здоровых доноров под воздействием TNF α статистически значимо повышалась экспрессия только генов *TRIM1* и *6*. При этом индукция иммунного ответа не приводила к подавлению экспрессии ни одного из проанализированных генов *TRIM*. Все это указывает на небольшие изменения иммунного ответа на воспалительный стимул с участием генов *TRIM* в ТДН пациентов с БП в сравнении с контрольными клетками.

Таким образом, нами выявлен спектр генов семейства *TRIM*, экспрессия которых изменена в клетках нейронального и глиального ряда пациентов с БП по сравнению с соответствующими клетками здоровых доноров, а также обнаружены особенности функционирования генов *TRIM* в условиях воспалительного ответа, индуцированного TNF α .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

За последнее время накопилось много данных, свидетельствующих о тесной взаимосвязи между иммунной и нервной системами организма, нарушение которой в ряде случаев может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний [1, 2, 36]. Известно, что БП обусловлена преимущественной дегенерацией дофаминергических нейронов черной субстанции, однако патология не ограничивается нарушениями лишь в нейрональных клетках. Глиальные клетки, преимущественно астроциты, также играют существенную роль в развитии этой патологии, особенно в контексте семейных форм заболевания. В норме астроциты осуществляют межклеточные взаимодействия с другими типами клеток, выполняют трофическую и опорную функции в отношении нейронов, а также проявляют иммунологическую активность [35, 37]. Астроцитарные клетки способны синтезировать нейротрофические факторы, эпидермальный фактор роста, некоторые цитокины, в том числе участвующие в работе врожденной иммунной системы (TNF α , IL-1 β , IL-6 и др.). В физиологических условиях эти цитокины секретируются на низком уровне, однако их количество возрастает при воздействии цитокинов активированной микроглии [3, 35]. В настоящее время известно, что патологические изменения в глии встречаются, если не при всех, то при большинстве нейродегенеративных заболеваний. Все это говорит о том, что клетки глии активно вовлечены во взаимодействие между иммунной и нервной системами.

Существует множество предположений о молекулярных процессах, лежащих в основе развития БП [2, 38]. В частности, показана роль механизмов, запускаемых врожденным иммунитетом [4]. Многие факторы и сигнальные пути, индуцируемые воспалением, одновременно участвуют и в регуляции апоптоза. Активность апоптоза, в свою очередь,

оказывает влияние на выраженность нейровоспаления и может быть его причиной. Например, известно, что процесс фагоцитоза апоптотических клеток индуцирует синтез противовоспалительных медиаторов, однако при неэффективности процесса элиминации погибших клеток в тканях устанавливается длительное хроническое воспаление [39].

Гены семейства *TRIM* выполняют разнообразные функции в тканях мозга [8]. С одной стороны, они оказывают разнонаправленное влияние на процессы апоптоза, с другой, принимают активное участие в процессах врожденного иммунитета на разных этапах передачи сигнала и могут служить как положительными, так и отрицательными регуляторами воспаления. Ранее показано, что некоторые гены *TRIM* вовлечены в патогенез БП и ряда других нейродегенеративных заболеваний [18, 20–23]. Таким образом, совокупность известных данных позволяет предположить, что гены семейства *TRIM* могут служить связующим звеном между иммунной и нервной системой в процессах нейродегенерации.

В нашем исследовании идентифицированы гены семейства *TRIM*, экспрессия которых изменена в глиальных и нейрональных клетках пациентов с БП по сравнению с клетками здоровых доноров. Нами показано, что эти изменения могут быть разнонаправленными в зависимости от типа клеток. Например, экспрессия *TRIM2* и *TRIM24* снижена в глии, но повышена в ТДН, полученных от пациентов с БП. Повышение экспрессии *TRIM2* в нейронах индуцирует убиквитинзависимую деградацию проапоптотического белка *Vim*, способствуя нейропротекции при ишемии [40], т.е. может играть защитную роль при БП. Можно предположить, что *TRIM24* выполняет похожую функцию в ТДН пациентов с БП, так как в других типах клеток он также способен противодействовать апоптозу [41, 42]. Роль пониженной экспрессии *TRIM2* и *TRIM24* в глии при БП ясна не до конца и требует дополнительных исследований, однако можно предположить, что это снижение негативно влияет на защитную роль этих генов в НГ.

Экспрессия генов *TRIM5* и *TRIM22* снижена как в глии, так и в ТДН пациентов с БП. Это, возможно, защищает клетки от гибели, так как есть данные, что *TRIM22* способствует апоптозу в нейронах, действуя через путь NF- κ B/NLRP3 [43]. Повышение экспрессии *TRIM67* в ТДН пациентов с БП может снижать нейровоспаление [44] и, по-видимому, также оказывает защитный эффект. Однако существуют данные, согласно которым повышение уровня *TRIM28*, наблюдаемое нами в клетках пациента с БП, способствует накоплению и токсичности α -синуклеина и может, видимо, способствовать развитию этого заболевания [45].

Данные о работе генов *TRIM* в астроцитах и других глиальных клетках практически отсутствуют,

однако наиболее выраженные изменения мы наблюдали именно в глиальных культурах. Интересно, что экспрессия множества генов *TRIM* в глии пациентов с БП была ниже, чем в аналогичных клетках, полученных от здоровых доноров. Анализ опубликованных данных [43, 46–52] выявил указания на то, что угнетение активности ряда генов *TRIM*, дифференциально экспрессирующихся в нашей работе, оказывает противовоспалительный и противоапоптотический эффект при БП. Так, подавление экспрессии гена *TRIM47* может приводить к уменьшению воспаления и процессов апоптоза в мозге животных при анестезии [46] и церебральной ишемии [47]. Снижение экспрессии гена *TRIM34* уменьшает митохондриальную дисфункцию и апоптоз в ряде клеточных линий различного происхождения [48, 49]. Подавление экспрессии *TRIM32* также противодействовало нейрональному апоптозу при стрессе [50] и при ишемии [51], как и подавление экспрессии *TRIM22* [43]. Пониженная экспрессия *TRIM16* [52] и *TRIM22* [43] может приводить к угнетению воспаления.

В то же время, опубликованы данные о том, что подавление экспрессии некоторых генов *TRIM* в различных тканях, напротив, сопровождается усилением воспалительного ответа (*TRIM5* [53], *TRIM9* [33], *TRIM34* [48, 54], *TRIM16* [55], *TRIM24* [56], *TRIM32* [57], *TRIM38* [58], *TRIM69* [59]) и апоптоза (*TRIM2* [40], *TRIM16* [60] и *TRIM66* [61]). Значительное повышение экспрессии *TRIM6* и *TRIM36* в глии пациентов с БП также может быть связано с более активным воспалением или апоптозом. Так, *TRIM6* участвует в ROS-опосредованном воспалении в эпителиальных клетках почечных канальцев [62], а *TRIM36* способствует каспазозависимому апоптозу при гепатоцеллюлярной карциноме [63].

Таким образом, наблюдаемые нами изменения экспрессии генов *TRIM* как в ТДН, так и в НГ пациентов с БП, по-видимому, оказывают разнонаправленное влияние на активность процессов, связанных с нейровоспалением и апоптозом.

При индукции воспаления с помощью TNF α в НГ экспрессия многих генов *TRIM* остается пониженной в клетках пациентов с БП по сравнению с клетками здоровых доноров или еще более снижается. В контексте упомянутых выше данных можно говорить о роли отдельных *TRIM* в изменении воспалительного ответа в глиальных клеточных линиях, полученных от пациентов с БП, который может оказывать патологическое действие на нейроны, соседствующие с глиальными клетками в мозге.

При индукции воспаления в ТДН наблюдается активация экспрессии большинства рассматриваемых генов как в клетках здоровых людей, так и при БП. Так, активация генов *TRIM2*, *3* и *67* может быть связана с запуском программ нейро-

протекции [21, 40, 44]. Однако данные об экспрессии генов *TRIM8*, *14*, *17* и *22* говорят о возможной патологической роли их активации [43, 64–66]. Экспрессия генов *TRIM1* и *6* под воздействием TNF α увеличивались в ТДН здоровых доноров, в то время как в аналогичных клетках пациентов с БП этого не происходило, что привлекает дополнительный интерес к этим генам. Согласно опубликованным данным, *TRIM1* подавляет токсическое накопление *LRRK2*, одного из основных белков, участвующих в патогенезе семейной формы БП [67]. Снижение его экспрессии в условиях воспалительной стимуляции может быть решающим у пациентов с этой формой БП. Механизм действия *TRIM6* пока не установлен, хотя возможная ассоциация *TRIM6* с БП показана ранее [22, 68].

Таким образом, в результате проведенной нами работы идентифицированы гены мультигенного семейства *TRIM*, дифференциально экспрессирующиеся при БП как в нейрональных клетках, так и в глии. Установлено, что в НГ изменена экспрессия бóльшего числа генов *TRIM*, чем в ТДН и НП. При этом активность таких генов в глии пациентов с БП преимущественно снижена (*TRIM2*, *4*, *5*, *9*, *16*, *22*, *24*, *32*, *34*, *38*, *47*, *66* и *69*) и еще больше снижалась при стимуляции воспаления с помощью TNF α . В ТДН пациентов с БП наблюдается как повышенная (*TRIM2*, *24*, *28* и *67*), так и пониженная (*TRIM5*, *22* и *61*) экспрессия представителей семейства *TRIM*. При индукции воспаления в ТДН активируется экспрессия большинства рассматриваемых генов как у здоровых доноров, так и у пациентов с БП. Выявлены представители семейства *TRIM*, уровень активности которых по-разному изменяется в соответствующих типах клеток пациентов с БП и здоровых доноров (*TRIM1* и *6*). В целом, анализ функций генов *TRIM*, экспрессия которых различалась в клетках здоровых доноров и пациентов с БП, не выявил определенной направленности (активирующей или ингибирующей воспаление и апоптоз). Можно предположить, что снижение экспрессии ряда генов *TRIM* в глии пациентов с БП изменяет присущий этим клеткам воспалительный ответ, который, в свою очередь, может способствовать нарушениям в работе нейронов и их последующей гибели. Дальнейшее изучение роли белков семейства *TRIM* в процессах нейродегенерации чрезвычайно актуально для понимания механизмов взаимосвязи между иммунной и нервной системами при развитии БП.

Исследование проведено с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Центр клеточных и генных технологий” Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, Россия.

Выполнение работы поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (№ Электронного бюджета – 075-15-2023-324) (в части получения нейрональных и глиальных производных). В части определения экспрессии генов *TRIM* работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов. Описание клеточных линий, полученных от людей с их информированного согласия, приведено в статьях, где они впервые упоминаются.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ejlerskov P., Hultberg J.G., Wang J., Carlsson R., Ambjørn M., Kuss M., Liu Y., Porcu G., Kolkova K., Friis Rundsten C., Ruscher K., Pakkenberg B., Goldmann T., Loreth D., Prinz M., Rubinsztein D.C., Issazadeh-Navikas S. (2015) Lack of Neuronal IFN- β -IFNAR causes Lewy body- and Parkinson’s disease-like dementia. *Cell*. **163**, 324–339.
2. Zeng X.S., Geng W.S., Jia J.J., Chen L., Zhang P.P. (2018) Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 109.
3. Милюхина И.В., Карпенко М.Н., Тимофеева А.А., Клименко В.М., Скоромец А.А. (2013) Роль воспаления в патогенезе болезни Паркинсона. *Неврологический журнал*. **18**, 51–55.
4. Richards R.I., Robertson S.A., O’Keefe L.V., Fornarino D., Scott A., Lardelli M., Baune B.T. (2016) The enemy within: innate surveillance-mediated cell death, the common mechanism of neurodegenerative disease. *Front. Neurosci.* **10**, 193.
5. Dias-Carvalho A., Sá S.I., Carvalho F., Fernandes E., Costa V.M. (2024) Inflammation as common link to progressive neurological diseases. *Arch. Toxicol.* **98**, 95–119.
6. vanTol S., Hage A., Giraldo M.I., Bharaj P., Rajsbaum R. (2017) The TRIMendous role of TRIMs in virus-host interactions. *Vaccines* (Basel). **5**, pii: E23.
7. Khan R., Khan A., Ali A., Idrees M. (2019) The interplay between viruses and TRIM family proteins. *Rev. Med. Virol.* **2019**, e2028.
8. Nenasheva V.V., Tarantul V.Z. (2020) Many faces of TRIM proteins on the road from pluripotency to neurogenesis. *Stem Cells Dev.* **29**, 1–14.
9. Reymond A., Meroni G., Fantozzi A., Merla G., Cairo S., Luzi L., Riganelli D., Zanaria E., Messali S., Cainarca S., Guffanti A., Minucci S., Pelicci P.G., Ballabio A. (2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* **20**, 2140–2151.
10. Watanabe M., Hatakeyama S. (2017) TRIM proteins and diseases. *J. Biochem.* **161**, 135–144.
11. Stepanenko E., Bondareva N., Sheremet A., Fedina E., Tikhomirov A., Gerasimova T., Poberezhnyy D., Makarova I., Tarantul V., Zigangirova N., Nenasheva V.

- (2023) Identification of key *TRIM* genes involved in response to *Pseudomonas aeruginosa* or *Chlamydia* spp. Infections in human cell lines and in mouse organs. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 13290.
12. Deng N.H., Zhou Z.X., Liu H.T., Tian Z., Wu Z.F., Liu X.Y., Xiong W.H., Wang Z., Jiang Z.S. (2022) TRIMs: generalists regulating the NLRP3 inflammasome signaling pathway. *DNA Cell Biol.* **41**, 262–275.
 13. Hatakeyama S. (2017) TRIM family proteins: roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 297–311.
 14. Tarantul V.Z. (2018) Many faces of TRIM family proteins on the field of oncoimmunology. *Universal J. Oncol.* **1**, 1–37.
 15. Park Y.H., Pyun J.M., Hodges A., Jang J.W., Bice P.J., Kim S., Saykin A.J., Nho K; AddNeuroMed consortium and the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2021) Dysregulated expression levels of APOE4 in peripheral blood are associated with brain atrophy and amyloid- β deposition in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* **13**, 183.
 16. Heo H., Park H., Lee M.S., Kim J., Kim J., Jung S.Y., Kim S.K., Lee S., Chang J. (2023) TRIM22 facilitates autophagosome-lysosome fusion by mediating the association of GABARAPs and PLEKHA7. *Autophagy.* **27**, 1–16.
 17. Logue M.W., Lancour D., Farrell J., Simkina I., Fallin M.D., Lunetta K.L., Farrer L.A. (2018) Targeted sequencing of Alzheimer disease genes in African Americans implicates novel risk variants. *Front. Neurosci.* **12**, 592.
 18. Tanji K., Kamitani T., Mori F., Kakita A., Takahashi H., Wakabayashi K. (2010) TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurobiol. Dis.* **38**, 210–218.
 19. Liu Y., Zhu M., Lin L., Fan X., Piao Z., Jiang X. (2014) Deficiency of TRIM27 protects dopaminergic neurons from apoptosis in the neurotoxin model of Parkinson's disease. *Brain Res.* **1588**, 17–24.
 20. Dong W., Qiu C., Gong D., Jiang X., Liu W., Liu W., Zhang L., Zhang W. (2019) Proteomics and bioinformatics approaches for the identification of plasma biomarkers to detect Parkinson's disease. *Exp. Ther. Med.* **18**, 2833–2842.
 21. Dong W., Luo B., Qiu C., Jiang X., Shen B., Zhang L., Liu W., Zhang W. (2020) TRIM3 attenuates apoptosis in Parkinson's disease via activating PI3K/AKT signal pathway. *Aging (Albany NY)*. **13**, 735–749.
 22. Nenasheva V.V., Novosadova E.V., Makarova I.V., Lebedeva O.S., Grefenshtein M.A., Arsenyeva E.L., Antonov S.A., Grivennikov I.A., Tarantul V.Z. (2017) The transcriptional changes of *TRIM* genes associated with Parkinson's disease on a model of human induced pluripotent stem cells. *Mol. Neurobiol.* **54**, 7204–7211.
 23. Feyeux M., Bourgois-Rocha F., Redfern A., Giles P., Lefort N., Aubert S., Bonnefond C., Bugi A., Ruiz M., Deglon N., Jones L., Peschanski M., Allen N. D., Perrier A. L. (2012) Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3883–3895.
 24. Heinz A., Schilling J., van Roon-Mom W., Krauß S. (2021) The MID1 protein: a promising therapeutic target in Huntington's disease. *Front. Genet.* **12**, 761714.
 25. Лебедева О.С., Лагарькова М.А. (2018) Плюрипотентные стволовые клетки для моделирования и клеточной терапии болезни Паркинсона. *Биохимия.* **83**, 1318–1330.
 26. Beevers J.E., Caffrey T.M., Wade-Martins R. (2013) Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived dopaminergic models of Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1503–1508.
 27. Novosadova E., Anufrieva K., Kazantseva E., Arsenyeva E., Fedoseyeva V., Stepanenko E., Poberezhniy D., Illarioshkin S., Novosadova L., Gerasimova T., Nenasheva V., Grivennikov I., Lagarkova M., Tarantul V. (2022) Transcriptome datasets of neural progenitors and neurons differentiated from induced pluripotent stem cells of healthy donors and Parkinson's disease patients with mutations in the *PARK2* gene. *Data Brief.* **41**, 107958.
 28. Novosadova E.V., Arsenyeva E.L., Antonov S.A., Kazantseva E.A., Novosadova L.V., Kurko O.D., Illarioshkin S.N., Tarantul V.Z., Grivennikov I.A. (2020) Generation and characteristics of glial cells from induced human pluripotent stem cells. *Neurochem.* **37**, 358–367.
 29. Gerasimova T., Stepanenko E., Novosadova L., Arsenyeva E., Shimchenko D., Tarantul V., Grivennikov I., Nenasheva V., Novosadova E. (2023) Glial cultures differentiated from iPSCs of patients with PARK2-associated Parkinson's disease demonstrate a pro-inflammatory shift and reduced response to TNF α stimulation. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 2000.
 30. Subramanian V.S., Teafatiller T., Agrawal A., Kitazawa M., Marchant J.S. (2021) Effect of lipopolysaccharide and TNF α on neuronal ascorbic acid uptake. *Mediators Inflamm.* **2021**, 4157132.
 31. Livak K., Schmittgen T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods (San-Diego (Calif))*. **25**, 402–408.
 32. Dudley-Fraser J., Rittinger K. (2023) It's a TRIM-entous view from the top: the varied roles of TRIPartite Motif proteins in brain development and disease. *Front. Mol. Neurosci.* **16**, 1287257.
 33. Zeng J., Wang Y., Luo Z., Chang L.C., Yoo J.S., Yan H., Choi Y., Xie X., Deverman B.E., Gradinaru V., Gup-ton S.L., Zlokovic B.V., Zhao Z., Jung J.U. (2019) TRIM9-mediated resolution of neuroinflammation confers neuroprotection upon ischemic stroke in mice. *Cell. Rep.* **27**, 549–560.e6.
 34. Shi M., Cho H., Inn K.S., Yang A., Zhao Z., Liang Q., Versteeg G.A., Amini-Bavil-Olyaei S., Wong L.Y., Zlokovic B.V., Park H.S., Garcia-Sastre A., Jung J.U. (2014) Negative regulation of NF- κ B activity by brain-specific TRIPartite Motif protein 9. *Nat. Commun.* **5**, 4820.
 35. Giovannoni F., Quintana F. J. (2020) The role of astrocytes in CNS inflammation. *Trends Immunol.* **41**, 805–819.
 36. Marogianni C., Sokratous M., Dardiotis E., Hadjigeorgiou G.M., Bogdanos D., Xiromerisiou G. (2020) Neu-

- rodegeneration and Inflammation—an interesting interplay in Parkinson’s disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8421.
37. Neal M., Richardson J.R. (2018) Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1864**, 432–443.
 38. Brooker S.M., Naylor G.E., Krainc D. (2024) Cell biology of Parkinson’s disease: mechanisms of synaptic, lysosomal, and mitochondrial dysfunction. *Curr. Opin. Neurobiol.* **85**, 102841. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2024.102841>
 39. Yang Y., Jiang G., Zhang P., Fan J. (2015) Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil. Med. Res.* **2**, 12.
 40. Thompson S., Pearson A.N., Ashley M.D., Jessick V., Murphy B.M., Gafken P., Henshall D.C., Morris K.T., Simon R.P., Meller R. (2011) Identification of a novel Bcl-2-interacting mediator of cell death (Bim) E3 ligase, tripartite motif-containing protein 2 (TRIM2), and its role in rapid ischemic tolerance-induced neuroprotection. *J. Biol. Chem.* **286**, 19331–19339.
 41. Wang P., Shen N., Liu D., Ning X., Wu D., Huang X. (2018) TRIM24 siRNA induced cell apoptosis and reduced cell viability in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol. Med. Rep.* **18**, 369–376.
 42. Li C., Xin H., Shi Y., Mu J. (2020) Knockdown of TRIM24 suppresses growth and induces apoptosis in acute myeloid leukemia through downregulation of Wnt/GSK-3 β / β -catenin signaling. *Hum. Exp. Toxicol.* **39**, 1725–1736.
 43. Kang C., Lu Z., Zhu G., Chen Y., Wu Y. (2021) Knockdown of TRIM22 relieves oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and inflammation through inhibition of NF- κ B/NLRP3 axis. *Cell. Mol. Neurobiol.* **41**, 341–351.
 44. Yu Y., Xia Q., Zhan G., Gao S., Han T., Mao M., Li X., Wang Y. (2023) TRIM67 alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by protecting neurons and inhibiting neuroinflammation via targeting I κ B α for K63-linked polyubiquitination. *Cell Biosci.* **13**, 99.
 45. Rousseaux M.W., de Haro M., Lasagna-Reeves C.A., De Maio A., Park J., Jafar-Nejad P., Al-Ramahi I., Sharma A., See L., Lu N., Vilanova-Velez L., Klisch T.J., Westbrook T.F., Troncoso J.C., Botas J., Zoghbi H.Y. (2016) TRIM28 regulates the nuclear accumulation and toxicity of both alpha-synuclein and tau. *Elife*, **5**, e19809.
 46. Zhu Y., Zhang M., Wang J., Wang Q. (2023) Knocking down TRIM47 ameliorated sevoflurane-induced neuronal cell injury and cognitive impairment in rats. *Exp. Brain Res.* **241**, 1437–1446.
 47. Hao M.Q., Xie L.J., Leng W., Xue R.W. (2019) TRIM47 is a critical regulator of cerebral ischemia-reperfusion injury through regulating apoptosis and inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **515**, 651–657.
 48. Zhang P., Chen Z., Li J., Mao H., Hu Y. (2024) TRIM34 suppresses non-small-cell lung carcinoma via inducing mTORC1-dependent glucose utilization and promoting cellular death. *Arch. Biochem. Biophys.* **754**, 109925.
 49. An X., Ji B., Sun D. (2020) TRIM34 localizes to the mitochondria and mediates apoptosis through the mitochondrial pathway in HEK293T cells. *Heliyon*, **6**, e03115.
 50. Goyani S., Shinde A., Shukla S., Saranga M.V., Currim F., Mane M., Singh J., Roy M., Gohel D., Chandak N., Vasiyani H., Singh R. (2024) Enhanced translocation of TRIM32 to mitochondria sensitizes dopaminergic neuronal cells to apoptosis during stress conditions in Parkinson’s disease. *FEBS J.* **291**(12), 2636–2655. <https://doi.org/10.1111/febs.17065>
 51. Wei L., Zhang J.S., Ji S.F., Xu H., Zhao Z.H., Zhang L., Pang L., Zhang J.F., Yang P.B., Ma H. (2019) Knockdown of TRIM32 protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury. *Neurochem. Res.* **44**, 2182–2189.
 52. Munding C., Keller M., Niklaus G., Papin S., Tschopp J., Werner S., Beer H.D. (2006) The estrogen-responsive B box protein: a novel enhancer of interleukin-1 β secretion. *Cell Death Differ.* **13**, 1938–1949.
 53. Saha B., Mandell M.A. (2023) The retroviral restriction factor TRIM5/TRIM5 α regulates mitochondrial quality control. *Autophagy*, **19**, 372–373.
 54. Lian Q., Yan S., Yin Q., Yan C., Zheng W., Gu W., Zhao X., Fan W., Li X., Ma L., Ling Z., Zhang Y., Liu J., Li J., Sun B. (2021) TRIM34 attenuates colon inflammation and tumorigenesis by sustaining barrier integrity. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 350–362.
 55. Shi M., Su F., Dong Z., Shi Y., Tian X., Cui Z., Li J. (2022) TRIM16 exerts protective function on myocardial ischemia/reperfusion injury through reducing pyroptosis and inflammation via NLRP3 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **632**, 122–128.
 56. Hang Y., Tan L., Chen Q., Liu Q., Jin Y. (2021) E3 ubiquitin ligase TRIM24 deficiency promotes NLRP3/caspase-1/IL-1 β -mediated pyroptosis in endometriosis. *Cell. Biol. Int.* **45**, 1561–1570.
 57. Fu Q., Zou M.M., Zhu J.W., Zhang Y., Chen W.J., Cheng M., Liu C.F., Ma Q.H., Xu R.X. (2017) TRIM32 affects the recovery of motor function following spinal cord injury through regulating proliferation of glia. *Oncotarget*, **8**, 45380–45390.
 58. Lu Z., Deng M., Ma G., Chen L. (2022) TRIM38 protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation injury via the TRAF6/TAK1/NF- κ B signalling pathway. *PeerJ*, **10**, e13815.
 59. Li L.J., Zheng J.C., Kang R., Yan J.Q. (2019) Targeting TRIM69 alleviates high fat diet (HFD)-induced hippocampal injury in mice by inhibiting apoptosis and inflammation through ASK1 inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **515**, 658–664.
 60. Xing H., Xu P., Ma Y., Li T., Zhang Y., Ding X., Liu L., Keerman M., Niu Q. (2024) TFEB ameliorates DEHP-induced neurotoxicity by activating GAL3/TRIM16 axis dependent lysophagy and alleviating lysosomal dysfunction. *Environ. Toxicol.* **39**(7), 3779–3789. <https://doi.org/10.1002/tox.24221>
 61. Zhang H., Zheng Y., Zhang Y. (2021) Knockdown of TRIM66 in MDA-MB-468 triple negative breast cancer cell line suppresses proliferation and promotes apoptosis through EGFR signaling. *Pol. J. Pathol.* **72**, 160–166.

62. Liao L., Tao P., Xu Q., Chen W., Chen J., Liu W., Liu W., Hu J., Lu J. (2024) TRIM6 promotes ROS-mediated inflammasome activation and pyroptosis in renal tubular epithelial cells via ubiquitination and degradation of GPX3 protein. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. **29**, 58.
63. Tong Q., Yi M., Kong P., Xu L., Huang W., Niu Y., Gan X., Zhan H., Tian R., Yan D. (2022) TRIM36 inhibits tumorigenesis through the Wnt/ β -catenin pathway and promotes caspase-dependent apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int*. **22**, 278.
64. Zhao W., Zhang X., Chen Y., Shao Y., Feng Y. (2020) Downregulation of TRIM8 protects neurons from oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation-induced injury through reinforcement of the AMPK/Nrf2/ARE antioxidant signaling pathway. *Brain Res*. **1728**, 146590.
65. Xie X., Wang F., Li X. (2022) Inhibition of TRIM14 protects cerebral ischemia/reperfusion injury through regulating NF- κ B/NLRP3 pathway-mediated inflammation and apoptosis. *J. Recept. Signal. Transduct. Res*. **42**, 197–205.
66. Mojsa B., Mora S., Bossowski J.P., Lassot I., Desagher S. (2015) Control of neuronal apoptosis by reciprocal regulation of NFATc3 and TRIM17. *Cell Death Differ*. **22**, 274–286.
67. Stormo A.E.D., Shavarebi F., FitzGibbon M., Earley E.M., Ahrendt H., Lum L.S., Verschueren E., Swaney D.L., Skibinski G., Ravisankar A., van Haren J., Davis E.J., Johnson J.R., Von Dollen J., Balen C., Porath J., Crosio C., Mirescu C., Iaccarino C., Dauer W.T., Nichols R.J., Wittmann T., Cox T.C., Finkbeiner S., Krogan N.J., Oakes S.A., Hiniker A. (2022) The E3 ligase TRIM1 ubiquitinates LRRK2 and controls its localization, degradation, and toxicity. *J. Cell Biol*. **221**, e202010065.
68. Kaut O., Schmitt I., Tost J., Busato F., Liu Y., Hofmann P., Witt S.H., Rietschel M., Fröhlich H., Willner U. (2017) Epigenome-wide DNA methylation analysis in siblings and monozygotic twins discordant for sporadic Parkinson's disease revealed different epigenetic patterns in peripheral blood mononuclear cells. *Neurogenetics*. **18**, 7–22.

Expression Profiles of Trim Family Genes in Neuronal and Glial Cell Cultures of Healthy Donors and Patients with Parkinson's Disease under Normal Conditions and Upon Neuroinflammation

V. V. Nenasheva¹, E. V. Novosadova¹, T. P. Gerasimova², L. V. Novosadova¹,
A. Y. Kotok¹, E. L. Arsenyeva¹, E. A. Stepanenko^{1, *}, I. A. Grivennikov¹, V. Z. Tarantul¹

¹National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

²Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical
Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency
of the Russian Federation, Moscow, 119435 Russia

*e-mail: katishsha@mail.ru

Proteins of the TRIM family are involved in both innate immunity and the nervous system processes and may play an important role in the development of neurodegenerative diseases. In this work, we analyzed the expression of 35 genes of the *TRIM* family in neural progenitors (NPs), terminally differentiated neurons (TDNs) and glial derivatives (NGs) obtained from induced pluripotent stem cells (iPSCs) of healthy donors (HD) and patients with Parkinson's disease (PD), in the absence of inflammatory stimuli and upon the induction of a nonspecific inflammatory response under the influence of TNF α . In NPs and TDNs of PD patients, compared with HD cells, differences in expression were observed for only a small number of *TRIM* genes. Under the influence of TNF α in TDNs, the expression of individual *TRIM* genes was activated, which was more significant in the cells of patients with PD compared to cells of HDs. In NGs of PD patients, the expression of many *TRIM* genes was initially reduced compared to HD cells and remained low or further decreased after exposure to TNF α . The data obtained demonstrate differences in the network of the *TRIM* family members in PD neurons and glia compared to control, and also show the multidirectional influence of the inflammatory stimulus on the expression of a number of *TRIM* genes in these types of cells. Considering the important role of many *TRIM* genes in the functioning of the innate immune system, it can be assumed that, in PD, more significant disturbances in the functioning of genes of this family occur in glia compared to neurons.

Keywords: *TRIM* family genes, differential expression, Parkinson's disease, iPSCs, neural progenitors, neurons, glia, induction of inflammatory response

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
№ 0110239 от 8 февраля 1993 г., выдано Министерством печати и информации Российской Федерации

Подписано к печати 99.99.2024 г. Дата выхода в свет 99.99.2024 г. Формат 60 × 88 1/8 Усл. печ. л. 99.99 Уч.-изд. л. 99.99
Тираж экз. Зак. Цена свободная

Учредители: Российская академия наук, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14
Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24 ФГБУ «Издательство «Наука»
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.
Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1

16+

- Автоматика и телемеханика
 Агрохимия
 Азия и Африка сегодня
 Акустический журнал
 Астрономический вестник. Исследования Солнечной системы
 Астрономический журнал
 Биологические мембраны
 Биология внутренних вод
 Биология моря
 Биоорганическая химия
 Биофизика
 Биохимия
 Ботанический журнал
 Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук
 Вестник древней истории
 Вестник Российской академии наук
 Вестник российской сельскохозяйственной науки
 Водные ресурсы
 Вопросы истории естествознания и техники
 Вопросы ихтиологии
 Вопросы языкознания
 Вулканология и сейсмология
 Высокомолекулярные соединения. Серия А
 Высокомолекулярные соединения. Серия Б
 Высокомолекулярные соединения. Серия С
 Генетика
 Геология рудных месторождений
 Геомагнетизм и аэрономия
 Геоморфология и палеогеография
 Геотектоника
 Геохимия
 Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология
 Государство и право
 Дефектоскопия
 Дифференциальные уравнения
 Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления
 Доклады Российской академии наук. Науки о жизни
 Доклады Российской академии наук. Науки о Земле
 Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки
 Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах
 Журнал аналитической химии
 Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова
 Журнал вычислительной математики и математической физики
 Журнал неорганической химии
 Журнал общей биологии
 Журнал общей химии
 Журнал органической химии
 Журнал прикладной химии
 Журнал физической химии
 Журнал эволюционной биохимии и физиологии
 Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Записки Российского минералогического общества
 Зоологический журнал
 Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа
 Известия Российской академии наук. Механика твердого тела
 Известия Российской академии наук. Серия биологическая
 Известия Российской академии наук. Серия географическая
 Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка
 Известия Российской академии наук. Серия физическая
 Известия Российской академии наук. Теория и системы управления
 Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана
 Известия Российской академии наук. Энергетика
 Известия Русского географического общества
 Исследование Земли из космоса
 Кинетика и катализ
 Коллоидный журнал
 Координационная химия
 Космические исследования
 Кристаллография
 Латинская Америка
 Лёд и Снег
 Лесоведение
 Литология и полезные ископаемые
 Мембраны и мембранные технологии
 Металлы
 Микология и фитопатология
 Микробиология
 Микроэлектроника
 Молекулярная биология
 Нейрохимия
 Неорганические материалы
 Нефтехимия
 Новая и новейшая история
 Общественные науки и современность
 Общество и экономика
 Океанология
 Онтогенез
 Палеонтологический журнал
 Паразитология
 Петрология
 Письма в Астрономический журнал
 Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования
 Почвоведение
 Приборы и техника эксперимента
 Прикладная биохимия и микробиология
 Прикладная математика и механика
 Проблемы Дальнего Востока
 Проблемы машиностроения и надежности машин
 Проблемы передачи информации
 Программирование
 Психологический журнал
 Радиационная биология. Радиоэкология
 Радиотехника и электроника
 Радиохимия
 Расплавы
 Растительные ресурсы
 Российская археология
 Российская история
 Российская сельскохозяйственная наука
 Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова
 Русская литература
 Русская речь
 Сенсорные системы
 Славяноведение
 Современная Европа
 Социологические исследования
 Стратиграфия. Геологическая корреляция
 США & Канада: экономика, политика, культура
 Теоретические основы химической технологии
 Теплофизика высоких температур
 Успехи современной биологии
 Успехи физиологических наук
 Физика Земли
 Физика и химия стекла
 Физика металлов и металловедение
 Физика плазмы
 Физикохимия поверхности и защита материалов
 Физиология растений
 Физиология человека
 Химическая физика
 Химия высоких энергий
 Химия твердого топлива
 Цитология
 Человек
 Экология
 Экономика и математические методы
 Электрохимия
 Энтомологическое обозрение
 Этнографическое обозрение
 Ядерная физика