

# Механизмы формирования устойчивости *Neisseria gonorrhoeae* к цефалоспорином

О.С. Кожушная, Е.Л. Васильева, Н.В. Фриго, В.С. Соломка

## Mechanisms of the formation of *Neisseria gonorrhoeae* resistance to cephalosporins

O.S. KOZHUSHNAYA, YE.L. VASILYIEVA, N.V. FRIGO, V.S. SOLOMKA

об авторах:

О.С. Кожушная — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и кожных болезней ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва  
Е.Л. Васильева — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и кожных болезней ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва  
Н.В. Фриго — д.м.н., заместитель директора по научно-образовательной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва  
В.С. Соломка — к.б.н., ведущий научный сотрудник научной части ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Приведен обзор современных данных литературы, посвященных вопросам изучения механизмов формирования резистентности *Neisseria gonorrhoeae* к цефалоспорином третьего поколения. Отмечена актуальность данного научного направления в связи с появлением штаммов, резистентных к цефалоспорином третьего поколения, и штаммов со сниженной чувствительностью. Показано важное значение в развитии резистентности *Neisseria gonorrhoeae* к β-лактамным антибиотикам мутаций в генах *porB*, *penA*, *mtrR*, *penB*, *ponA*; отмечена перспективность изучения мозаичной структуры гена *penA*, кодирующего белок PBP2, а также пространственной структуры данного белка.

**Ключевые слова:** *Neisseria gonorrhoeae*, антимикробные препараты, резистентность, цефалоспорины, гены *porB*, *penA*, *mtrR*, *penB*, *ponA*, мозаичная структура гена *penA*, белок PBP2.

The authors provide a review of the present-day literature data on the issues of studying the mechanisms of the formation of *Neisseria gonorrhoeae* resistance to third-generation cephalosporins. Studies in this field are needed in connection with the occurrence of strains resistant to third-generation cephalosporins as well as low-sensitivity strains. The authors emphasize the importance of mutations in *porB*, *penA*, *mtrR*, *penB* and *ponA* genes in the development of *Neisseria gonorrhoeae* resistance to β-lactam antibiotics and describe the prospects of studying the mosaic structure of the *penA* gene encoding the PBP2 protein as well as spatial structure of this protein.

**Key words:** *Neisseria gonorrhoeae*, antimicrobial drugs, resistance, cephalosporins, *porB*, *penA*, *mtrR*, *penB*, *ponA* genes, mosaic structure of the *penA* gene, PBP2 protein.

■ Одним из важных условий успешной терапии гонококковой инфекции является определение чувствительности возбудителя *N. gonorrhoeae*, выделенного от больного, к антимикробным препаратам (АМП). Однако на практике при первичном обследовании пациента это исследование ввиду его трудоемкости и длительности либо отсутствия в медицинской организации налаженной культуральной диагностики гонококковой инфекции нередко не проводится, что вызы-

вает необходимость определения антимикробных препаратов выбора для терапии гонококковой инфекции.

Следует отметить, что в последние десятилетия в связи с возникновением устойчивости *N. gonorrhoeae* к АМП и широким распространением штаммов *N. gonorrhoeae*, резистентных к различным группам АМП, происходит смена препаратов выбора, применяемых для лечения гонококковой инфекции. Так, в 1987 г. на смену пенициллину, а затем и тетрациклином приш-

ли фторхинолоны и цефалоспорины третьего поколения [1]. Однако с середины 1990-х годов прошлого века начали появляться сообщения о неудачах в лечении гонококковой инфекции с применением фторхинолонов и участвовавших случаях резистентности к ним штаммов *N. gonorrhoeae* [2—4]. Широкое распространение резистентности *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам привело к их исключению из схем эмпирической терапии гонококковой инфекции в странах Европы и США [5, 6]. С 2010 г. на основании результатов многолетнего мониторинга резистентности *N. gonorrhoeae* к АМП, проводившегося на территории Российской Федерации при научно-методическом и организационном руководстве Государственного научного центра дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, фторхинолоны были исключены из схем терапии гонококковой инфекции на территории РФ [7].

Препаратами выбора, рекомендуемыми для лечения гонококковой инфекции, в настоящее время являются цефалоспорины третьего поколения [8, 9], в частности цефтриаксон и цефиксим [10]. Однако в последние годы все чаще появляются сообщения о выявлении штаммов *N. gonorrhoeae* со сниженным уровнем чувствительности к цефалоспорином [11—16].

Первые случаи неудачного лечения гонококковой инфекции цефалоспорином третьего поколения были описаны в начале 2000 г. [17, 18], а в 2011 г. был впервые выделен резистентный к цефалоспорином штамм *N. gonorrhoeae* [19]. Имеющихся к настоящему времени данных вполне достаточно, чтобы понять важность и необходимость исследований, направленных на выяснение молекулярных механизмов развития такой устойчивости. Представление об этих механизмах должно быть учтено при создании АМП как той же биохимической группы, так и принципиально новых.

Цефалоспорины, как и пенициллины, по своей структуре относятся к большой группе β-лактамов, и снижение чувствительности *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином может быть связано с общими для β-лактамов механизмами развития резистентности [20]. К настоящему времени уже известны различные молекулярные механизмы устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллинам; возможно, некоторые из них могут играть важную роль и в снижении чувствительности *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином.

Можно предположить, что в результате продолжительного применения различных АМП у *N. gonorrhoeae*, как и у многих других микроорганизмов, сформировались два основных пути формирования антибиотикорезистентности: приобретение новых для бактерии генов — детерминант резистентности и изменения в собственном геноме. Новые для бактерий гены резистентности переносятся с помощью подвижных генетических элементов — плазмиды и транспозонов в результате их горизонтального переноса. Чаще все-

го с подвижными элементами передаются и гены ферментов, инактивирующих антибиотики.

К изменению собственного генома относится появление мутаций в генах, кодирующих мишени действия антибиотиков, систему эффлюкса, а также пориновых каналов [21].

Устойчивость *N. gonorrhoeae* к пенициллинам чаще всего обусловлена наличием гена пенициллиназы (*TEM-1* β-лактамазы), кодирующего фермент, разрушающий β-лактамовое кольцо антибиотика [9, 22]. Однако следует отметить, что цефалоспориноаза, характерная для некоторых других микроорганизмов [23], у *N. gonorrhoeae* до сих пор не обнаружена [24].

К хромосомным механизмам формирования устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам относят в первую очередь появление мутаций в генах *ponA* и *penA*, приводящих к снижению аффинности пенициллинсвязывающих белков [25]. Изменение нуклеотидного состава в гене *ponA* приводит к замене аминокислоты Leu на Pro в положении 421 белковой цепи [26], а инсерция трех нуклеотидов в гене *penA* приводит к появлению аминокислоты Asp в положении 345 [27].

Помимо модификации белков-мишеней причиной формирования устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам может быть изменение проницаемости клеточной стенки и/или системы эффлюкса. При этом важную роль в развитии резистентности играют специфические мутации в промотере и кодирующей части гена *mtrR*, посредством которых через снятие репрессии увеличивается число MtrC-MtrD-MtrE-помп эффлюкса [28]. Увеличение количества помп эффлюкса приводит к развитию устойчивости микроорганизмов к некоторым гидрофильным антибиотикам, в том числе и к пенициллинам [29].

Еще одной молекулой, участвующей в формировании устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллину, является белок наружной мембраны — порин PorB1b. Мутации в кодирующем его гене *penB* приводят к снижению проницаемости мембраны для гидрофильных антибиотиков [30]. Однако эти мутации не повышают резистентность микроорганизма к β-лактамам при отсутствии мутации в гене *mtrR*. Это дает основания предполагать, что MtrC-MtrD-MtrE-помпа и PorB1b, работая совместно, вызывают повышение устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллину путем ограничения концентрации антибиотика в периплазме микроорганизма [31].

Помимо перечисленных выше механизмов устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллинам можно добавить, что мутации или делеция гена *pilQ2* (ранее называвшегося *penC*) повышают пенициллиноустойчивость *N. gonorrhoeae*, если при этом присутствуют детерминанты устойчивости в генах *penA*, *mtrR* и *penB*. Это происходит предположительно потому, что *pilQ* формирует во внешней мембране *N. gonorrhoeae* поры, через которые антибиотики диффундируют в пери-

плазму [32]. Однако роль мутаций в гене *pilQ* в возникновении резистентности *N. gonorrhoeae* к β-лактамам окончательно не установлена [33].

В настоящее время группы ученых из Японии, США и Австралии ведут исследования молекулярно-генетических механизмов устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином, и из всех вышеописанных механизмов особое место отводится роли пенициллинсвязывающего белка РВР2.

Большое значение для понимания механизмов развития резистентности *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином имеет работа М. Ito и соавт. [34], подробно изучивших взаимосвязь снижения чувствительности *N. gonorrhoeae* к цефиксиму и мозаичной структуры гена *penA*, кодирующего белок РВР2, которая, как полагают, является результатом межвидовой генетической рекомбинации *N. gonorrhoeae*, *N. cinera* и *N. perflava*.

Наличие мозаичности в структуре РВР2 у штаммов *N. gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью к цефалоспорином отмечалась и ранее [25], но именно в исследовании М. Ito и соавт. был проведен ее тщательный анализ. Кроме того, М. Ito и соавт. было предложено классифицировать все полученные последовательности белка РВР2 на группы, исходя из расположения мутаций в гене *penA*, т. е. по характеру мозаичности гена. Этой классификацией многие исследователи пользуются до сих пор [12, 35], однако становится ясно, что для развития антибиотикорезистентности имеет значение не сам факт мозаичности, а наличие конкретных мутаций, возможные варианты сочетаний и их количество.

Пока не ясно, какие именно мутации РВР2 определяют снижение чувствительности к цефалоспорином у штаммов *N. gonorrhoeae*. Так, в исследовании В. Whiley и соавт., направленном на выявление мутаций в белковой цепи РВР2 у штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных в период с 1988 по 2005 г., было показано, что 22 из 25 штаммов с мутацией А501V в белковой цепи, отнесенных к XIII типу по Ito, имели сниженную чувствительность к цефтриаксону [35]. Анализ показал, что такая мутация повышает минимальную подавляющую концентрацию (МПК) цефиксима и других цефалоспоринов в 2—4 раза [36]. Согласно работам М. Ito и соавт. [34] и R. Lindberg и соавт. [33], замена аминокислоты в позиции 501 также присутствовала у некоторых гонококков со сниженной чувствительностью к цефтриаксону, но не была отнесена к какой-либо группе по характеру расположения мутаций.

В экспериментах S. Takahata и соавт. [36] отмечалось, что основной мутацией в гене *penA*, приводящей к изменению структуры РВР2 и двух- или четырехкратному увеличению резистентности *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином, является мутация, приводящая к замене глицина на серин в положении 545 белковой

цепи (G545S). Замена изолейцина в положении 312 на метионин (I312M) и валина в позиции 316 белковой цепи на треонин (V316T) в присутствии мутации G545S снижала чувствительность *N. gonorrhoeae* к цефиксиму, цефибутену и цефподоксиму еще в 4 раза. Таким образом, важную роль для развития резистентности *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином, по-видимому, могут играть мутации, приводящие к следующим аминокислотным заменам в РВР2: G545S, I312M, V316T, A501V.

Позднее группой исследователей под руководством J. Tomberg был проведен ряд экспериментов, которые подтвердили ключевую роль четырех аминокислотных замен, описанных S. Takahata, в развитии антибиотикостойчивости *N. gonorrhoeae*, в особенности по отношению к цефиксиму [10]. Вместе с тем было установлено, что наличие только трех ключевых мутаций в гене *penA*, приводящих к заменам аминокислот, а именно G545S, I312M, и V316T, обеспечивает штамму *N. gonorrhoeae* FA19 (дикий тип) относительно невысокое повышение МПК пенициллина, цефтриаксона и цефиксима (в 1,5, 1,5 и 3,5 раза соответственно). Этот факт позволил предположить, что способность данных мутаций существенно повышать устойчивость *N. gonorrhoeae* к β-лактамам зависит от присутствия других мутаций в мозаичных аллелях *penA*. Авторами также было подтверждено значение мутации, приводящей к замене аминокислоты в положении 501 белковой цепи (A501V), которая до сих пор была обнаружена только в гене *penA*, не имеющей мозаичной структуры [35,37,38]. Эксперимент по переносу мозаичного аллеля гена *penA* с мутацией, приводящей к замене аминокислоты в положении 501 белковой цепи (A501V), в изоляте *N. gonorrhoeae* с хромосомно-обусловленной устойчивостью к пенициллину привел к повышению МПК цефтриаксона и цефиксима до пограничного уровня (0,4 и 1,2 г/мл соответственно). Полученные результаты еще раз показали большую значимость возникновения данной мутации в гене *penA* *N. gonorrhoeae*, так как она является строго специфичной именно для *N. gonorrhoeae* и до сих пор не обнаружена у других представителей *Neisseria spp.* Скорее всего, данная мутация является результатом реакции микроорганизма на селективное давление, оказываемое цефалоспорином — антимикробными препаратами широкого спектра действия. Это предположение подтверждается и сообщениями S. Takahata и соавт. о спонтанном возникновении мутации A501V при проведении экспериментов по трансформации штаммов *N. gonorrhoeae* [36].

В исследованиях J. Tomberg и соавт. была обозначена еще одна мутация — N512Y, которая вносит вклад в снижение чувствительности гонококка к цефалоспорином [10]. Большинство исследователей считают, что значительную роль в развитии устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам, в частности к цефало-

споринам, играет инсерция Asp-345 [33—35]. Ее значение для снижения чувствительности *N. gonorrhoeae* к цефалоспоринам отмечается и в работе М. Ito и соавт. [34].

Однако для оценки вклада того или иного изменения молекулярной структуры генов и белков в развитие устойчивости микроорганизма к антибиотику помимо аминокислотной последовательности важно знать пространственную структуру белка. Недавно группой ученых из США [39] была получена третичная структура белка РВР2. Проведенное исследование было направлено на выяснение роли отдельных мутаций РВР2 в развитии устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллину, однако полученные результаты и выводы вполне могут быть применены и при анализе механизмов развития резистентности *N. gonorrhoeae* к цефалоспоринам ввиду сходства молекул этих антибиотиков (рис. 1).

В структуре РВР2 выделяют два домена: N-концевой (терминальный) и С-терминальный транспептидазный (или пенициллинсвязывающий) (рис. 2). Такая структура характерна для всех РВР белков. N-терминальный домен вытянут, имеет длину около 45 ангстрем и состоит из нескольких  $\beta$ -тяжей и субдомена, включающего короткие тяжи и небольшие спирали. Функциональная роль этого домена остается неясной. Высказано предположение, что он может способствовать правильной ориентации каталитической части фермента от цитоплазматической мембраны к пептидогликановому субстрату, так как подобная функция описана для С-домена белка РВР5 *E. coli* [40].

Транспептидазный домен также может быть разделен на две составляющие его части:  $\alpha$ - и  $\alpha/\beta$ -субдомены с расположенным в углублении между ними активным центром фермента. Интересной особенностью этого фрагмента является выступающая  $\beta$ -складчатая структура, располагающаяся по ходу аминокислотной цепи между спиралями  $\alpha 2$  и  $\alpha 4$ .

В белках РВР2, выделенных из резистентных штаммов *N. gonorrhoeae*, в подавляющем большинстве случаев именно на этом участке обнаруживается инсерция аспаргиновой кислоты (Asp-345a) [41].

Мутации в С-терминальном домене, которые могут привести к снижению чувствительности *N. gonorrhoeae* к  $\beta$ -лактамам, должны располагаться на участках, формирующих активный центр, либо в непосредственной близости от него, чтобы иметь возможность влиять на архитектуру активного центра. С другой стороны, привнесенные изменения должны приводить к снижению реакционной способности фермента в отношении антибиотика, не нарушая при этом его нормальной функции, т. е. транспептидазной активности. Среди подобных мутаций в белковой цепи РВР2 авторы отмечают четыре основных: три из них — F504L, A510V и A516G — расположены в  $\beta 4$  или в разорванной петле между  $\beta 4$  и  $\beta 3$ , еще одна — P551S — находится в спирали  $\alpha 11$ , которая лежит на С-конце белка (рис. 3). Предполагается, что последняя мутация может играть важную роль в формировании устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллину, так как по сравнению с РВР2 штамма *N. gonorrhoeae* дикого типа она в 3 раза снижает уровень ацилирования РВР2, в то время как аминокислотные замены F504L, A510V и A516G оказывают незначительное влияние (менее чем двукратное снижение ацилирования). Вместе с тем присутствие одновременно двух мутаций — F504L и P551S — снижает уровень ацилирования РВР2 почти таким же образом, что и четыре мутации одновременно. Полученные результаты позволили предположить, что именно эти две мутации С-домена (F504L и P551S) вносят основной вклад в развитие устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллину.

Мутантный белок РВР2 имеет более низкую температуру плавления по сравнению с белком дикого типа, следовательно, мутации, связанные с устойчивостью *N. gonorrhoeae* к пенициллину, вносят в структуру белка некоторый дестабилизирующий эффект.

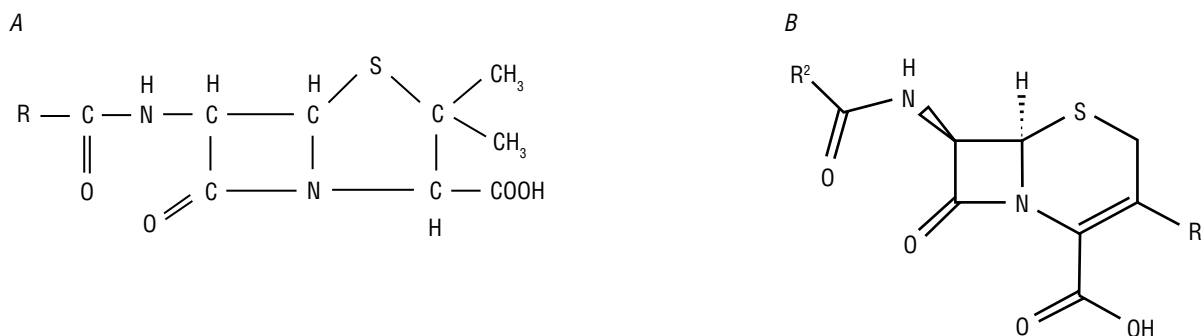


Рис. 1. Структурная организация молекул пенициллина (А), цефалоспорина (В)

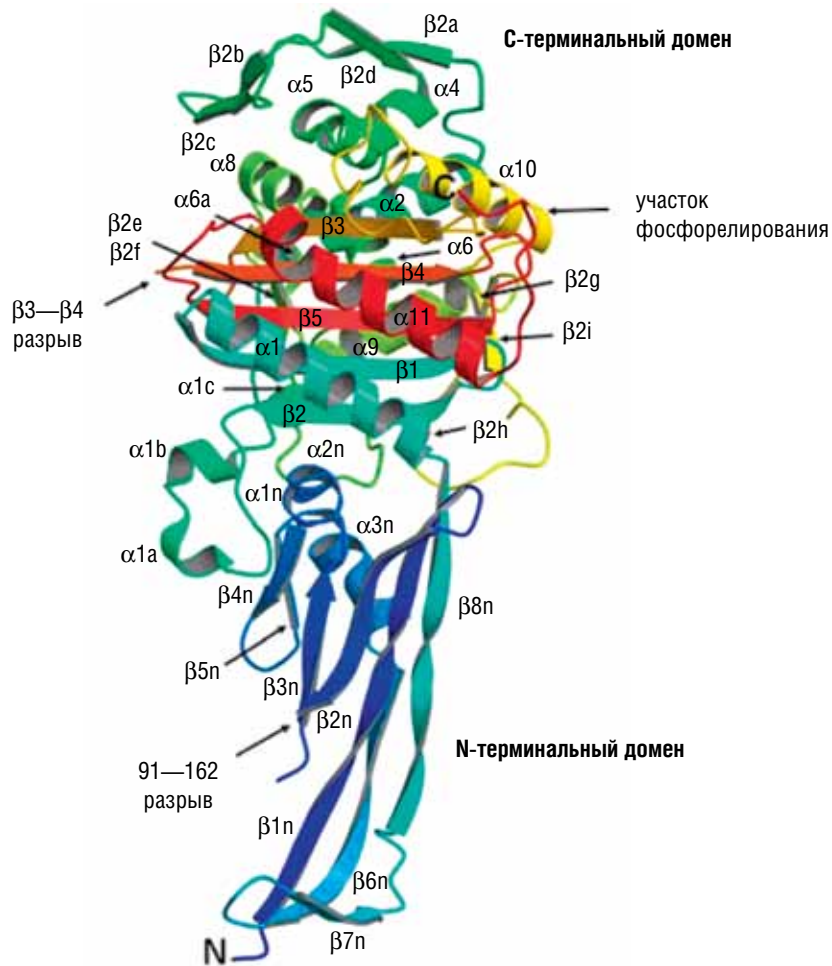


Рис. 2. Структура RBP2 *N. gonorrhoeae* (цит. по: [39])

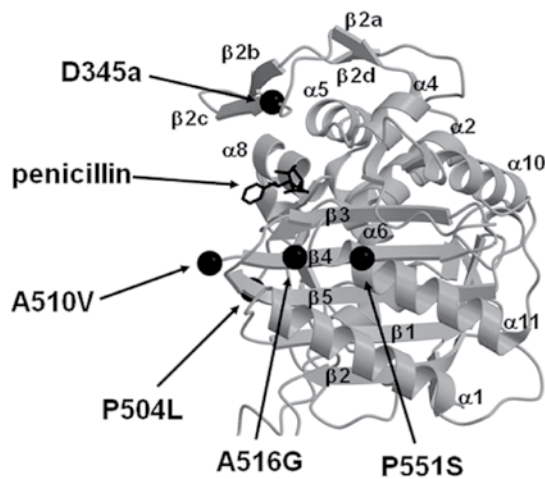


Рис. 3. Расположение мутаций, связанных с устойчивостью к пенициллину, в структуре RBP2 [39]. Трехмерная структура транспептидазного домена RBP2, отражающая расположение мутаций вокруг активного центра фермента (содержит модель пенициллина в связанной форме). Мутации отмечены черными кружками



Неожиданностью оказалось то, что четыре мутации в С-концевом домене RBP2, снижающие уровень ацилирования белка почти в 5 раз, оказывают лишь незначительное влияние на его архитектуру. Это наблюдение можно объяснить двумя причинами: 1) мутации ведут к таким небольшим изменениям в структуре белка, что они не заметны на рентгенограмме, но вносят существенные изменения в кинетику, или 2) разные конформационные состояния фермента, имеющие разную ацилирующую активность, находятся в динамическом равновесии. Наличие мутаций смещает это равновесие в сторону дереактивации белка. Наблюдать эти состояния, используя метод кристаллографии, невозможно из-за того, что мутантный белок и белок дикого типа кристаллизуются только в одном, одинаковом конформационном состоянии.

Расположение мутаций вблизи активного центра фермента, влияющих на изменение чувствительности микроорганизма к антибиотику, не является уникальным для белка RBP2 *N. gonorrhoeae*. Такое явление описано для ацетилхолинэстеразы *Drosophila* [42], протеазы HIV-1 [43], цитохрома P450 *Candida albicans* [44] и некоторых других ферментов патогенных микроорганизмов. Таким образом можно предположить, что такое расположение мутаций является общей распространенной тенденцией при формировании устойчивости микроорганизмов к АМП. Интересной особенностью именно RBP2 *N. gonorrhoeae* оказалось то, что две аминокислотные замены располагаются на участке между  $\beta 3$  и  $\beta 4$  белковыми структурами, что подчеркивает важность этого региона. Значение другой мутации — инсерции аспарагиновой кислоты в положении 345 аминокислотной последовательности — отмечается многими исследователями, поскольку она наиболее часто встречается в белках, выделенных из резистентных как к пенициллину, так и к цефалоспорином штаммов *N. gonorrhoeae* [41]. Несмотря на то что эта мутация может снижать эффективность действия пенициллина (белка в отношении к пенициллину) более чем в 25 раз, в присутствии других мутаций ее эффективность резко снижается (снижение сродства к пенициллину только в 2 раза) [45]. Тот же эффект наблюдается для мутаций в С-терминальном домене. Эти данные позволяют предположить, что эти два типа изменений — Asp-345a и С-терминальные мутации — антагонистичны друг другу.

Мутации в С-терминальном домене RBP2 *N. gonorrhoeae*, обуславливающие устойчивость *N. gonorrhoeae* к пенициллину, оказывают незначительное влияние на структуру самого белка в отличие от механизмов, наблюдающихся у RBP2 *S. pneumoniae*, когда практически на всех уровнях организации белковой молекулы происходят серьезные перестройки [46]. Подобный механизм, при котором отдельные мутации не влияют на основную функцию фермента, но оказывают существенное влияние на

его взаимоотношения с АМП, может являться одним из путей эволюции антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов.

Присутствие мутации Asp-345a существенно влияет не только на активность фермента в отношении пенициллина, но и на структуру его молекулы. Такая инсерция не ведет к драматическим для белка и его основной функции последствиям потому, что введенная аминокислота замещает практически идентичную, которая находится в позиции 346 и восстанавливает все или почти все водородные связи, в которых та была задействована. Таким образом, не всякая инсерция может иметь место в данной позиции и баланс между развитием устойчивости к пенициллину и сохранением транспептидазной активности фермента весьма деликатен.

Штаммы *N. gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью к цефалоспорином могут иметь полирезистентный фенотип. Почти всегда они проявляют устойчивость к пенициллинам, что вполне объяснимо, хотя могут быть нечувствительны и к другим группам антибиотиков [47]. Появление полирезистентных штаммов *N. gonorrhoeae* связывают в основном с Азиатско-Тихоокеанским регионом, а точнее с Японией. Так, в 2000 г. в Японии был выделен штамм *N. gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью к цефтриаксону [48]. Анализ чувствительности данного штамма к АМП показал, что он устойчив к действию пенициллина, тетрациклина, азитромицина и цiproфлоксацина. При этом в геноме штамма были обнаружены генетические детерминанты такой резистентности, т. е. мутации в генах *penA*, *ponA*, *mtrR*, *penB*, *gyrA* и *parC*. В 2001 г. четыре штамма *N. gonorrhoeae*, резистентные к пенициллину, тетрациклину и цiproфлоксацину и при этом имеющие сниженную чувствительность к цефиксиму, были выделены и на Гавайских островах [49]. Предполагается, что они могли быть занесены из Японии, так как штаммы со сходным спектром антибиотикорезистентности были получены там двумя годами ранее [18].

В 2011 г. в Японии был выделен штамм *N. gonorrhoeae* (H041) с самым высоким уровнем устойчивости к цефалоспорином: МПК цефтриаксона составила 2—4 г/мл, что в 4—8 раз выше соответствующего показателя у штаммов, описанных ранее [19]. Выделенный штамм оказался устойчивым к различным  $\beta$ -лактамам антибиотикам, фторхинолонам, макролидам, тетрациклином, триметоприм-сульфаметоксазолу, хлорамфениколу и нитрофурантоину, однако диско-диффузионный метод определения чувствительности штамма *N. gonorrhoeae* к АМП выявил наличие его чувствительности к спектиномицину [50]. Штамму H041 был присвоен новый NG-MAST сиквенс-тип (ST4220) и MLST сиквенс-тип (ST7363), были также генотипически охарактеризованы все основные детерминанты резистентности. Большинство

мутаций в ключевых генах, ответственных за развитие антибиотикорезистентности (*porB*, *penA*, *mtrR*, *penB*, *ponA1* (L421P), *pilQ*), были описаны у ранее выделенных штаммов *N. gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью к цефалоспорином, за исключением 12 аминокислотных замен в PBP2. Одна из этих мутаций (T486I) была обнаружена ранее в штаммах *N. meningitidis* и *N. flavescens*, а еще четыре — A311V, V316P, L328T и T484S — были выявлены у *Neisseria* spp. впервые.

Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод о том, что в структуре PBP2 *N. gonorrhoeae* за устойчивость к пенициллину и цефалоспорином отвечают изменения, возникающие на одних и тех же участках аминокислотной цепи. И хотя пока не ясно, какие конкретно мутации в гене, кодирующем данные участки, приводят к снижению чувствительности *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином, можно с высокой долей вероятности обозначить «ключевые места»

в последовательности белка, изменения в которых могут иметь важное значение для развития резистентности *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином: это переход  $\beta$ 3-структуры в  $\beta$ 4, спирали  $\alpha$ 11 и  $\alpha$ 2, а также определенная как  $\beta$ 2с-структура, несущая инсерцию Asp-345a. Все они окружают активный центр фермента и могут оказывать влияние на его архитектуру.

В настоящее время не прекращаются исследования, направленные как на выявление штаммов *N. gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью к цефалоспорином и анализ путей их распространения, так и на изучение молекулярных механизмов развития устойчивости к этой группе АМП. Можно надеяться, что в скором времени будут установлены локализация и характер ключевых мутаций, приводящих к развитию резистентности *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином, что позволит определить пути повышения эффективности антибиотикотерапии при лечении гонококковой инфекции. ■

## Литература

1. Watkins R.C., Hambrick E., Greene J. et al. Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* in a subset of nonemergent patients: I. A trend in the Washington, DC Area. *J Natl Med Assoc* 1991; 83: 8: 710—712.
2. Deguchi T., Yasuda M., Saito I. et al. Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Chemother* 1997; 3: 73—84.
3. Fenton K.A., Ison C., Johnson A.P. et al. Ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in England and Wales in 2002. *Lancet* 2003; 361: 1867—1869.
4. Dan M. The use of fluoroquinolones in gonorrhoea: the increasing problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 829—854.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 2010; 59 (RR-12): 1—114.
6. Bignell C. 2009 European (IUSTI/WHO) guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *International journal of STD & AIDS* 2009; 20 (7): 453—7.
7. Резистентность возбудителей ИППП к антибактериальным препаратам. Информационный бюллетень. М: ООО «ДЭК-ПРЕСС», 2010.
8. Ison C.A., Mouton J.W., Jones K. et al. Which cephalosporin for gonorrhoea? *Sex Transm Infect* 2004; 80: 386—388.
9. Jakopanec I., Borgen K., Aavitsland P. The epidemiology of gonorrhoea in Norway, 1993—2007: past victories, future challenges. *BMC Infectious Diseases* 2009; 9: 3.
10. Tomberg J., Unemo M., Davies C. Nicholas R.A. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. *Biochemistry* 2010; 49 (37): 8062—8070.
11. Ito M., Yasuda M., Yokoi S. et al. Remarkable increase in Central Japan in 2001-2002 of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to penicillin, tetracycline, oral cephalosporins, and fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Aug; 48: 8: 3185—3187.
12. Lo J.Y., Ho K.M., Leung A.O. et al. Ceftibuten resistance and treatment failure of *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 (10): 3564—3567.
13. Bala M., Ray K., Gupta S.M. et al. Changing trends of antimicrobial susceptibility patterns of *Neisseria gonorrhoeae* in India and the emergence of ceftriaxone less susceptible *N. gonorrhoeae* strains. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60 (3): 582—586.
14. Ochiai S., Sekiguchi S., Hayashi A. et al. Decreased affinity of mosaic-structure recombinant penicillin-binding protein 2 for oral cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60 (1): 54—60.
15. Schwebke J.R., Whittington W., Rice R.J. et al. Trends in susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ceftriaxone from 1985 through 1991. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39 (4): 917—920.
16. GRASP Steering Group. The Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP) Year 2007 report. London: Health Protection Agency; 2008. Available from: [http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1221117895841](http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1221117895841) [Last accessed 8 Dec 2008]
17. Akasaka S., Muratani T., Yamada Y. et al. Emergence of cephem- and aztreonam-high-resistant *Neisseria gonorrhoeae* that does not produce beta-lactamase. *J Infect Chemother* 2001; 7: 49—50.
18. Muratani T., Akasaka S., Kobayashi T. et al. Outbreak of cefepim- (penicillin, oral cepheps, and aztreonam)-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3603—3606.
19. Ohnishi, M., Saika T., Hoshina S. et al. Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 148—149.
20. Ison C.A., Bindayna K.M., Woodford N. et al. Penicillin and cephalosporin resistance in gonococci. *Genitourin Med* 1990; 66: 351—356.
21. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Успехи биологической химии* 2004; 44: 263—306.
22. Phillips I. Beta-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. *Lancet* 1976; 2: 656—657.
23. Nordmann P., Mammeri H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol* 2007; 2: 297—307.

24. Barry P.M., Klausner J.D. The use of cephalosporins for gonorrhea: the impending problem of resistance. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10 (4): 555—577.
25. Ameyama S., Onodera S., Takahata M. et al. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46 (12): 3744—3749.
26. Ropp P.A., M. Hu, M. Olesky et al. Mutations in *penA*, 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* 2002; 46: 769—777.
27. Brannigan J.A., Tirodimos I. A., Zhang Q. Y. et al. Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 1990; 4: 913—919.
28. Zaranonelli L., G. Borthagaray, E.H. Lee, et al. Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to *mtrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2468—2472.
29. Hagman K.E., Pan W., Spratt B.G. et al. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* 1995; 141: 611—622.
30. Olesky M., M. Hobbs, R.A. Nicholas. Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2811—2820.
31. Olesky M., Zhao S., Rosenberg R. L. et al. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with *penB* mutations. *J Bacteriol* 2006; 188: 2300—2308.
32. Zhao S., Tobiasson D.M., Hu M. et al. The *penC* mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. *Mol Microbiol* 2005; 57: 1238—1251.
33. Lindberg R., Fredlund H., Nicholas R. et al. *Neisseria gonorrhoeae* Isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *penA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: (6): 2117—2122.
34. Ito M., Deguchi T., Mizutani K. et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in Central Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49 (1): 137—143.
35. Whitley D., Limnios E. A., Ray S. et al. Diversity of *penA* alterations and subtypes in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Sydney, Australia, that are less susceptible to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 9: 3111—3116.
36. Takahata S., Senju N., Osaki Y. et al. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (11): 3638—3645.
37. Osaka, K., Takakura, T., Narukawa, K. et al. Analysis of amino acid sequences of penicillin-binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone. *J Infect Chemother* 2008; 14: 195—203.
38. Lee S.G., Lee H., Jeong S.H. et al. Various *penA* mutations together with *mtrR*, *porB* and *penA* mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime or ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65, 669—675.
39. Powell A.J., Tomberg J., Deacon A.M. et al. Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J Biol Chem* 2009; 284: (2): 1202—1212.
40. Davies C., White S.W., Nicholas R.A. Crystal structure of a deacylation-defective mutant of penicillin-binding protein 5 at 2.3-Å resolution. *J Biol Chem* 2001; 276, 616—623.
41. Dowson C.G., Jephcott A.E., Gough K.R. et al. Penicillin-binding protein 2 genes of non-beta-lactamase-producing, penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 1989; 3: 35—41.
42. Harel M., Kryger G., Rosenberry T. L. et al. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci* 2000; 9: 1063—1072.
43. Muzammil S., Ross P., Freire E. A major role for a set of non-active site mutations in the development of HIV-1 protease drug resistance. *Biochemistry* 2003; 42, 631—638.
44. Podust L.M., Poulos T.L., Waterman M.R. Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2001; 98: 3068—3073.
45. Brannigan J.A., Tirodimos I.A., Zhang Q.Y. et al. Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 1990; 4: 913—919.
46. Pernot L., Chesnel L., Le Gouellec A. et al. A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to beta-lactam antibiotics. *J Biol Chem* 2004; 279, 16463—16470.
47. Tapsall J. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *CMAJ*; 2009; 180 (3): 268—269.
48. Tanaka M., Nakayama H., Huruya K. et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 20—26.
49. Wang S.A., Lee M.V., O'Connor N. et al. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to cefixime—Hawaii 2001. *Clin Infect Dis* 2003; 37 (6): 849—852.
50. Ohnishi M., Golparian D., Shimuta K. et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhea.: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*; 55: 7: 3538—3545.