

КАНДИНОВ ИЛЬЯ ДЕНИСОВИЧ

**УСТОЙЧИВОСТЬ *NEISSERIA GONORRHOEAE* К β -ЛАКТАМНЫМ
АНТИБИОТИКАМ НА ФОНЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
И МИКРОЭВОЛЮЦИИ**

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории технологий молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат химических наук
Шаскольский Борис Леонидович,
старший научный сотрудник ИМБ РАН

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук
Васин Андрей Владимирович,
Директор Института биомедицинских систем и биотехнологий,
Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого

доктор биологических наук
Лазарев Василий Николаевич,
Заведующий лабораторией генной инженерии
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Защита диссертации состоится «25» мая 2023 г. в 13:00 часов на заседании Диссертационного Совета 24.1.081.01 (Д 002.235.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32 и на сайте ИМБ РАН <http://www.eimb.ru>
Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Анашкина А.А

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Гонококковая инфекция, вызываемая патогенным микроорганизмом *Neisseria gonorrhoeae*, является одной из самых опасных и распространенных инфекций, передаваемых половым путём (ИППП). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире ежегодно диагностируется более полумиллиарда случаев ИППП, из них порядка 80 миллионов случаев составляет гонорея (WHO, Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021). Возбудителем гонореи является грамотрицательный диплококк, характеризующийся высокой скоростью как фенотипических, так и генетических адаптивных изменений.

ВОЗ включила *N. gonorrhoeae* в список 12 патогенов, представляющих глобальную угрозу и требующих безотлагательной разработки новых лекарственных препаратов (Taccsonelli et al., 2018). Особое опасение вызывает то, что для каждого из препаратов, применяемых для лечения гонореи, обнаруживаются устойчивые к ним изоляты (Unemo et al., 2014). Естественная компетентность способствует развитию генетического разнообразия, в том числе, за счёт межвидового горизонтального транспорта генов. Помимо высокой скорости приобретения устойчивости к антимикробным препаратам за счет генетических изменений, гонококк способен уклоняться от иммунной системы человека вследствие фазовых вариаций. В настоящее время не существует эффективных вакцин против возбудителя гонококковой инфекции, что делает антимикробные препараты единственным и чрезвычайно важным инструментом в лечении гонореи.

Препаратами для терапии гонококковой инфекции в России и в мире являются антибиотики β -лактаминового ряда: цефалоспорины III поколения – цефтриаксон и цефиксим (Министерство здравоохранения Российской Федерации, приказ №415 от 20.08.2003; WHO, Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*, 2016). Однако в нескольких странах мира уже зарегистрированы подтвержденные неудачи лечения цефтриаксоном из-за устойчивости *N. gonorrhoeae* к данному препарату (Attram et al., 2019; Unemo et al., 2019). Вышеназванные явления рассматриваются системами здравоохранения разных стран как угроза репродуктивному здоровью населения. Отдельное опасение вызывает потенциальная опасность возникновения β -лактамаз расширенного спектра действия, способных гидролизовать цефалоспорины III поколения.

Современная российская популяция гонококка изучена недостаточно. Отсутствуют данные о молекулярных генотипах, циркулирующих на территории РФ, и их молекулярно-генетических характеристиках, не проведён анализ российской популяции в контексте глобального генетического ландшафта. У изолятов, обнаруженных на территории РФ, отсутствует информация о генетических детерминантах устойчивости к актуальным препаратам, что также объясняется отсутствием инструмента пригодного для массового эпидемиологического скрининга изолятов *N. gonorrhoeae*. В связи с этим важным и своевременным является изучение биологического разнообразия и микроэволюционных процессов в популяции *N. gonorrhoeae*, в том числе, приводящих к снижению чувствительности к антимикробным препаратам, получение клеточных моделей *N. gonorrhoeae* для оценки чувствительности к антимикробным препаратам и жизнеспособности, а также разработка метода, пригодного для массового эпидемиологического наблюдения за

встречаемостью детерминант резистентности к препаратам выбора с одновременным предсказанием уровней МПК.

Цель исследования

Установление особенностей генетического разнообразия и микроэволюционных процессов в популяции *N. gonorrhoeae*, связанных с применением антимикробных препаратов, в первую очередь, препаратов β -лактаминового ряда.

Задачи исследования

1. Провести генотипирование коллекции образцов ДНК клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных на территории РФ, выявить основные детерминанты устойчивости к β -лактаминам препаратам.

2. Определить характерные и доминирующие генотипы *N. gonorrhoeae* в России и в мире, провести их сравнительный филогенетический анализ.

3. Провести сравнительный полногеномный анализ преобладающих генотипов *N. gonorrhoeae* в России и других странах.

4. Разработать метод идентификации генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к β -лактаминам препаратам на основе олигонуклеотидного гидрогелевого биочипа. С использованием созданного метода получить генетические профили детерминант устойчивости.

5. Разработать математическую модель предсказания устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефтриаксону и пенициллину, используя данные, полученные при анализе коллекции, а также характеристики изолятов со всего мира.

6. Создать генно-инженерные клеточные модели *N. gonorrhoeae*, экспрессирующие β -лактамазы, в том числе расширенного спектра действия, для оценки устойчивости патогена к препаратам β -лактаминового ряда и жизнеспособности.

Научная новизна и практическая значимость

Выявлены доминирующие в России молекулярные типы *N. gonorrhoeae*, идентифицированы мутационные профили, ассоциированные с устойчивостью возбудителя к актуальным антимикробным препаратам. Филогенетический анализ изолятов показал генетическую отдалённость наиболее распространенных российских и европейских молекулярных типов, что указывает на локальный характер формирования и эволюции российской популяции возбудителя гонококковой инфекции.

Обнаружена функциональная зависимость между генотипами гонококка и аллелями гена *penA* – ключевой детерминанты устойчивости к цефалоспорином, что важно для мониторинга выявления в России штаммов, устойчивых к цефтриаксону.

Впервые проведено полногеномное секвенирование изолятов *N. gonorrhoeae*, преобладающих в России генотипов. Произведено сравнение полученных данных с наиболее распространёнными генотипами *N. gonorrhoeae* в мире. Для доминирующих в мировой популяции генотипов определены характерные гены, потенциально отражающие различные стратегии выживаемости.

Разработан гидрогелевый биочип для идентификации генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к актуальным препаратам для лечения гонореи - цефалоспорином III поколения. Впервые обнаружены изоляты РФ с мутациями, снижающими чувствительность к цефтриаксону, что подчеркивает

необходимость постоянного мониторинга антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* с использованием созданного биочипа. На основании полученных данных, а также характеристик изолятов *N. gonorrhoeae* из баз данных со всего мира разработан и валидирован метод предсказания устойчивости патогена к цефтриаксону на основе регрессионной модели. Созданный метод стал основой для разработки набора реагентов «NG-ТЕСТ» для идентификации генетических детерминант устойчивости возбудителя гонококковой инфекции *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином III поколения методом ПЦР с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе.

Создана генно-инженерная клеточная модель, позволяющая проводить оценку устойчивости *N. gonorrhoeae* к β -лактамам, включая пенициллины и цефалоспорины. Впервые показано, что штаммы *N. gonorrhoeae*, способные продуцировать β -лактамазу расширенного спектра действия TEM-20, эффективно расщепляющую цефалоспорины, обладают сниженной жизнеспособностью, что, возможно, объясняет отсутствие таких изолятов в мировой популяции гонококковой инфекции.

Методология и методы исследования

В работе использован комплекс современных молекулярно-биологических, микробиологических и статистических подходов. Ключевой инструмент для идентификации генетических детерминант лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином III поколения, на основе гидрогелевого биочипа, был разработан непосредственно автором работы. Оценка вклада генетических детерминант лекарственной устойчивости в уровень фенотипической чувствительности изолятов *N. gonorrhoeae* проведена на выборках значительного объёма образцов, что позволило получить статистически значимые результаты.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод идентификации генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к β -лактамам препаратам на основе олигонуклеотидного гидрогелевого биочипа позволяет выявлять мутации в генах *ponA*, *porB*, *mtrR* и *penA*, в том числе, с учётом мозаичной структуры гена *penA*.

2. Созданная регрессионная модель на основе анализа полиморфизмов в генах устойчивости к β -лактамам препаратам позволяет прогнозировать МПК с точностью до одного двукратного разведения.

3. Исследованная коллекция, состоящая из 951 образца ДНК клинических изолятов *N. gonorrhoeae*. Выявлены характерные для изолятов *N. gonorrhoeae* РФ геногруппы и установлено соответствие с аллелями *penA*.

4. Проведённый полногеномный анализ наиболее часто встречающихся молекулярных генотипов в России и мире позволил выявить характерные гены, среди которых оказались детерминанта устойчивости к β -лактамам - *penA*, и гены из системы секреции ДНК IV типа. Для глобально распространённых молекулярных типов выявлена ассоциация между снижением чувствительности изолятов *N. gonorrhoeae* к АМП и отсутствием нарушений в генах гонококкового острова, значимых для функционирования системы секреции ДНК IV типа.

5. Клеточная модель в которой экспериментально показано, что природному штамму *N. gonorrhoeae* достаточно одной аминокислотной замены Gly238Ser в плазмидном гене β -лактамазы, чтобы этот фермент приобрел способность гидролизовать цефалоспорины, сохраняя при этом способность к гидролизу пенициллинов. Генно-инженерный штамм *N. gonorrhoeae*, содержащий плазмиду с

вариантом гена *bla_{TEM}*, экспрессирующим β-лактамазу расширенного спектра действия TEM-20, способную гидролизовать цефалоспорины разных поколений, обладал сниженной жизнеспособностью.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Выносимые на защиту положения и выводы подкреплены фактическим материалом и отражают основные достижения соискателя по теме работы. Достоверность результатов определяется достаточным объёмом выборки анализируемых данных и их адекватной статистической обработкой.

Результаты работы были представлены на конференции молодых ученых «Геномика, метагеномика и молекулярная биология микроорганизмов» (Москва, 2022); VIII Пущинской конференции "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов" (Москва, 2022); XXI и XXII всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2021-22); III всероссийской конференции "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (Новосибирск, 2022); XXXIII зимней международной молодёжной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии (Москва, 2021); 3-ем Российском микробиологическом конгрессе (Псков, 2021); 9-ой всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию и редактированию (Москва, 2021); XXXIII зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2021).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 10 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ (9 – в зарубежных журналах, 1 – в отечественных журналах), 8 тезисов российских и зарубежных конференций, получено 2 патента РФ на изобретения.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 203 источников. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста и содержит 42 рисунка и 17 таблиц.

Материалы и методы исследования

В работе охарактеризована и проанализирована коллекция ДНК клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, полученных ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России в период 2013-2021 годов, из 16 субъектов РФ, включая Архангельскую, Астраханскую, Брянскую, Иркутскую, Калужскую, Новосибирскую, Омскую, Пензенскую, Псковскую, Рязанскую, Томскую, Челябинскую области, Республику Татарстан, Ставропольский край, Чувашскую Республику, г. Москва.

Первичную идентификацию *N. gonorrhoeae*, генно-инженерные работы по трансформации штаммов и оценке их жизнеспособности, а также определение фенотипической чувствительности к β -лактамам (цефтриаксону и пенициллину) и другим АМП, с установлением значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) проводили на базе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, располагающего соответствующими лицензиями на работу с микроорганизмами I и II групп патогенности и соответствующими условиями безопасности.

Процедура разработки метода идентификации генетических детерминант лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефалоспорином III поколения на основе гидрогелевого биочипа, в том числе, конструирование и синтез олигонуклеотидных зондов и праймеров, а также статистическая обработка результатов, детально описаны в соответствующем разделе диссертации.

Полногеномное секвенирование клинических изолятов *N. gonorrhoeae* проводили на двух платформах: секвенирующих ячейках FLO-MIN110 R9 и R10 на приборе MinION, Oxford Nanopore technologies и секвенаторе MiniSeq, Illumina. Гибридная сборка геномов *de novo* после секвенирования на двух платформах осуществлялась в программе Unicycler, версия 0.4.8.

Для моделирования кривых роста использовали обобщённое уравнение Ферхюльста (Peleg et al., 2011). Для моделирования кривых гибели в присутствии цефтриаксона для изолятов, не содержащих плазмиду *rbla*_{TEM-20}, использовали модифицированную модель Чика-Ватсона (Peleg, 2021). Подбор параметров уравнений осуществляли перебором решений задач Коши в MatLab 2021b при разных r , N_{assympt} , α для уравнения Ферхюльста и при разных k_{obs} для уравнения Чика-Ватсона с последующей оценкой полученного численного решения и результатов эксперимента с помощью метода наименьших квадратов. Статистическую значимость отличия полученных математических моделей, принадлежащим разным рядам данных, оценивали по критерию Фишера.

Построение регрессионной модели Пуассона, предсказывающей значения МПК цефтриаксона и пенициллина (логарифм по основанию 2), проводили в программе «RStudio» (пакет *stats* версии 3.6.2).

Филогенетические деревья по принципу максимального правдоподобия получали с использованием программного RAxML, версия 7.4.8, с числом итераций 999. Филогенетическую сеть строили с использованием программы «*SplitsTree 4.17.1*».

Результаты и обсуждение

Анализ молекулярных генотипов изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных на территории Российской Федерации.

В работе была сформирована и охарактеризована коллекция ДНК клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, всего 951 изолят. Для всех образцов определены молекулярные генотипы по протоколу *Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing (NG-MAST) (<https://pubmlst.org> «NG MAST v2.0»). Генотипирование позволило выявить 296 различных сиквенс-типов, представляющих 221 *porB* аллель и 96 *tbpB* аллелей. Характеристики российских изолятов по годам (2013-2018) представлены на (Рис. 1).

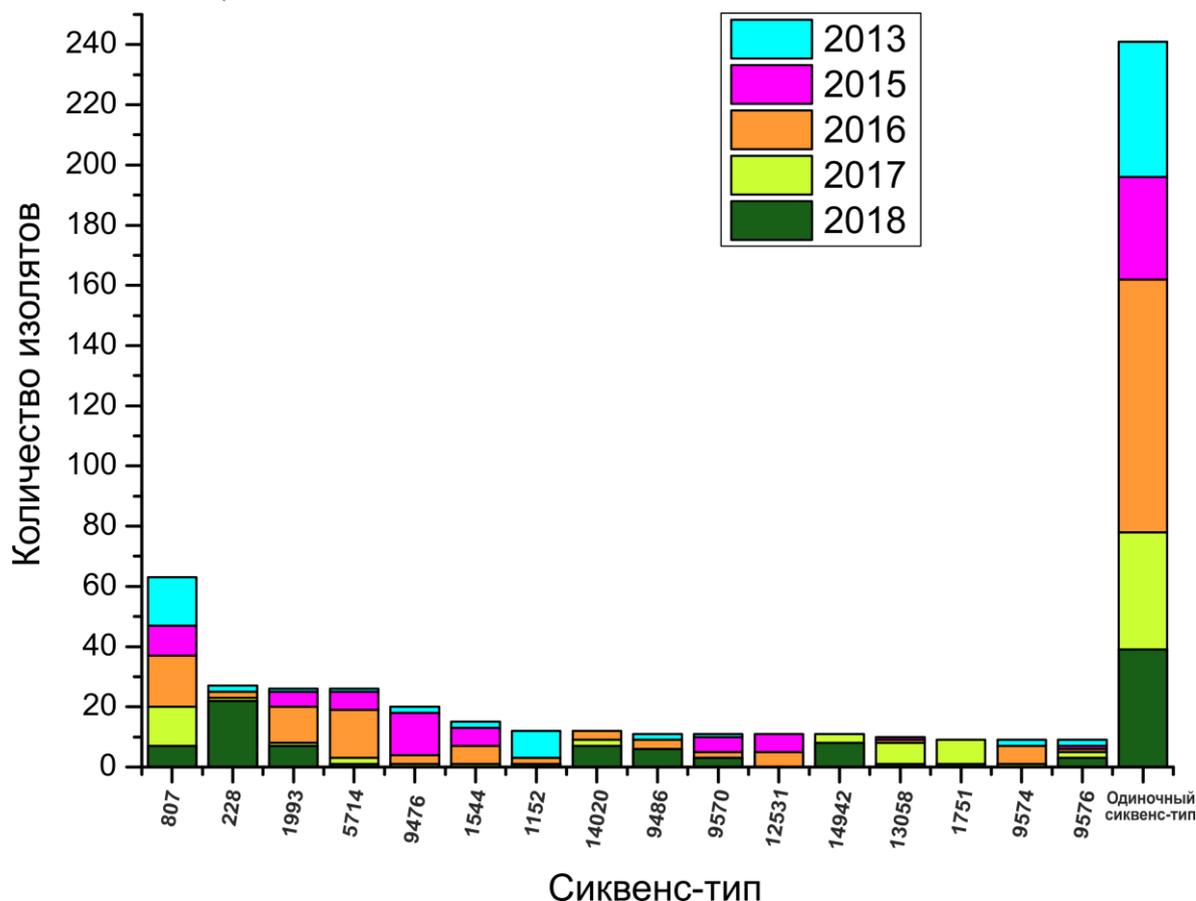


Рис. 1. Диаграмма распределения NG-MAST типов изолятов, собранных на территории РФ в 2013-2018 годах. На диаграмме представлены только группы, сформированные 9 или более изолятами, а также единичными сиквенс типами.

Анализ российской популяции *N. gonorrhoeae* показал, что преобладающая доля изолятов относится к уникальным российским NG-MAST типам, обнаруженным только в России. Доля изолятов с уникальными сиквенс-типами от общего количества изолятов сохранялась от года к году и в среднем составила ~83 %.

Для обнаруженных в России NG-MAST типов изолятов *N. gonorrhoeae*, построено филогенетическое древо по максимальному правдоподобию (Рис. 2). Год получения изолята соответствующего сиквенс-типа (2013-2018) указан по радиусу, отмечены также российские и европейские геногруппы. Европейские геногруппы выделены согласно опубликованным ранее данным европейского центра профилактики и контроля заболеваний (ECDC, 2018).

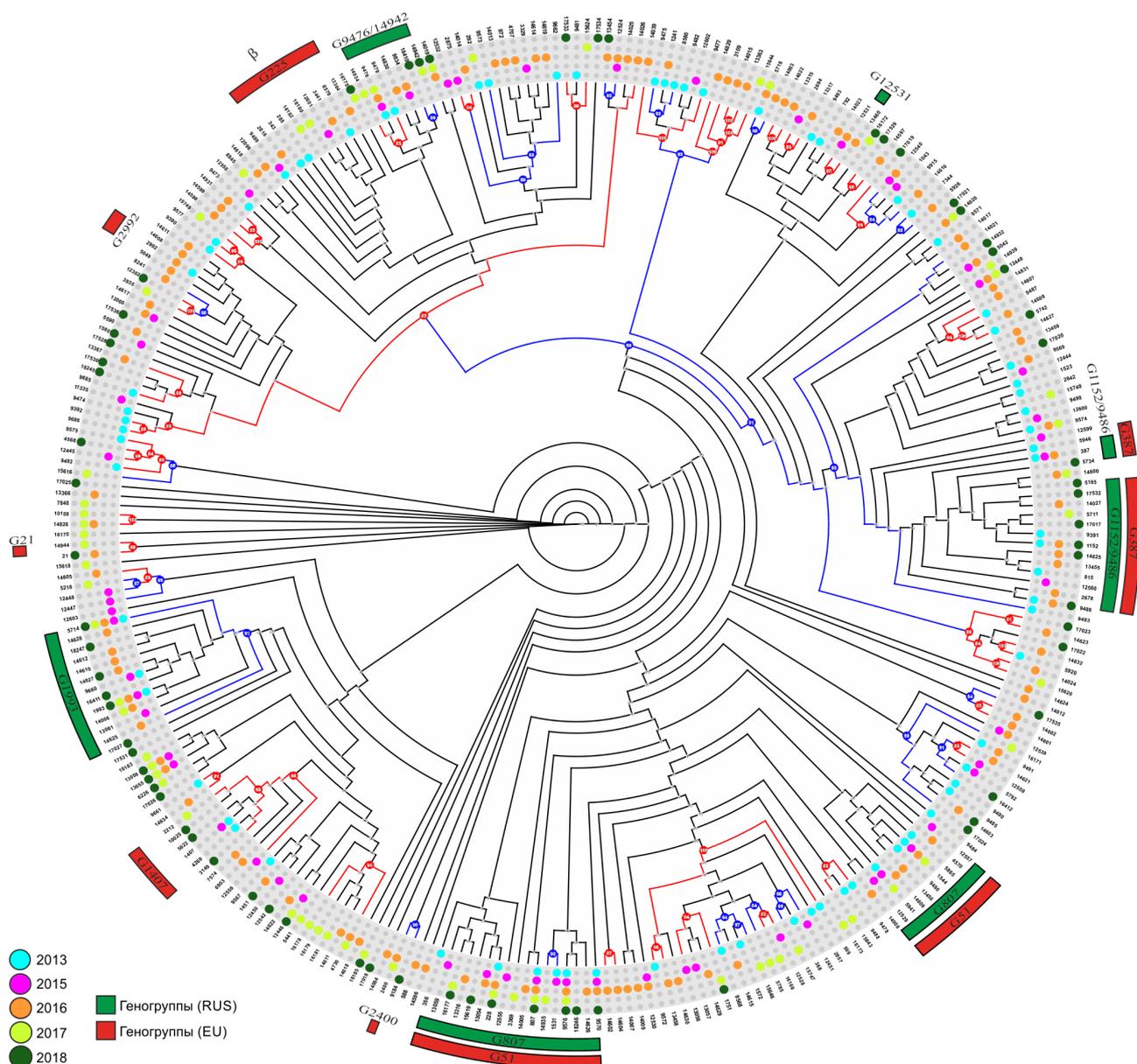


Рис. 2. Филогенетическое древо, для NG-MAST типов изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных на территории РФ в период 2013-2018 гг.

Анализ филогенетического древа для российских изолятов показал, что более 40% российских изолятов объединяются в две клады из преимущественно уникальных российских NG-MAST типов. Для наиболее распространенные в России сиквенс-типов выявлено семь основных геногрупп: G807, G1993, G9476, G14942, G1152, G9486, G12531.

Показано, что доминирующие в РФ сиквенс-типы и основные геногруппы сохраняются из года в год, что свидетельствует о значительном вкладе клонального размножения в структуру популяции возбудителя гонококковой инфекции. Доминирующей геногруппой *N. gonorrhoeae* в России оказалась G807. Особо стоит отметить, что изоляты данной геногруппы отличались чувствительностью к антимикробным препаратам, в особенности к актуальным цефалоспорином III поколения, что в целом характеризует российскую популяцию.

Анализ полученных данных позволил сделать вывод, о существовании соответствия между NG-MAST типом (геногруппой) и вариантом *penA* аллели. Так, типичным являлось присутствие внутри геногруппы только одного типа аллели гена *penA*. Все изоляты NG-MAST 228, NG-MAST 807, NG-MAST и другие, принадлежащие геногруппе G807, имели *penA* аллель немозаичный вариант I, т.е. вся геногруппа G807 несла аллель *penA* вариант I.

Нами обнаружено шесть изолятов, принадлежащих к широко распространенной в мире и представляющей большую опасность из-за ассоциации с мультирезистентными изолятами геногруппе G1407 (Harris et al., 2018). При этом филогенетический анализ показал, что все представители геногруппы G1407 обладали только мозаичной аллелью *penA* XXXIV типа, что подтверждает описанную выше функциональную зависимость типа аллели *penA* от NG-MAST типа. Все шесть обнаруженных в РФ изолятов со сниженной чувствительностью к цефалоспорином III поколения являлись представителями геногруппы G1407 и обладали мозаичной аллелью *penA* XXXIV типа.

Полногеномный анализ наиболее часто встречающихся NG-MAST генотипов *N. gonorrhoeae* в России и других странах

Для выяснения причин стабильно высокой встречаемости изолятов молекулярного типа 807 в России, было проведено секвенирование 25 изолятов с установленными ранее уровнями фенотипической чувствительности (Shaskolskiy et al., 2019) с использованием двух платформ, Illumina MiniSeq и MinION Oxford Nanopore technologies. Всего было получено 25 гибридных сборок *de novo* с использованием программы Unicycler.

Анализ баз данных PubMLST (<https://pubmlst.org>) и Pathogenwatch (<https://pathogen.watch/genomes/all?organismId=485>) показал, что наиболее распространенными в мире NG-MAST сиквенс-типами являются 225, 1407, 2400, 2992 и 4186, тогда как на территории Российской Федерации наиболее часто встречающимся является сиквенс-тип 807. Нами проведен филогенетический анализ с использованием полученных полногеномных сиквенсов *N. gonorrhoeae* (25 геномов *de novo*) принадлежащих сиквенс-типу 807 и геномов изолятов *N. gonorrhoeae* из базы данных Pathogenwatch принадлежащих наиболее распространенным в мире сиквенс-типам: 225, 1407, 2400, 2992 и 4186.

На основе полученных данных для оценки генетического разнообразия анализируемых NG-MAST типов построена филогенетическая сеть по кор-геномам (Рис. 5).

Филогения по кор-геномам показала, что разделение изолятов по NG-MAST типам соответствует разделению по полногеномному секвенированию. При этом генетическое разнообразие внутри каждого сиквенс-типа не одинаково. Наибольшая дивергенция наблюдалась для сиквенс-типов 2992 и 2400, наименьшая - для 4186. Таким образом, NG-MAST корректно описывает филогению *N. gonorrhoeae*, выявляемую по результатам полногеномного секвенирования, что позволило предположить наличие характерных генов и аллелей, отличающих один сиквенс-тип от других.

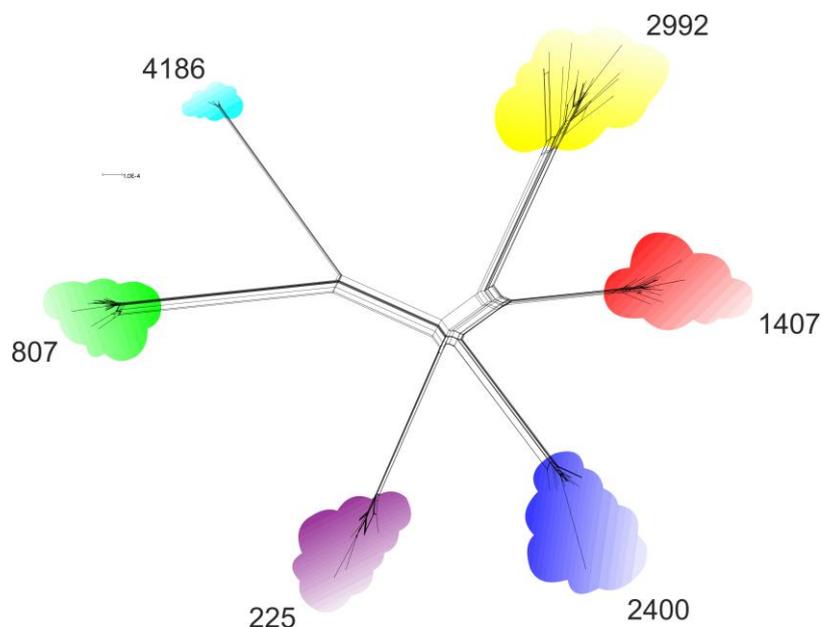


Рис. 5. Филогенетическая сеть кор-геномов для изолятов *N. gonorrhoeae* сиквенс-типов 225, 1407, 2400, 2992, 4186 и 807.

Выявление генов, характерных для каждого конкретного сиквенс-типа.

Для выявления генов, характерных для каждого сиквенс-типа, было проведено попарное сравнение геномов сиквенс-типов с использованием выбранных параметров: число генов, присутствующих в 80% и более геномах одного сиквенс-типа, встречаются менее, чем у 28% геномов другого сиквенс-типа (минорные компоненты). Результаты объединенных попарных сравнений геномов изолятов шести сиквенс-типов представлены на **Рис. 6** в виде диаграмм Венна.

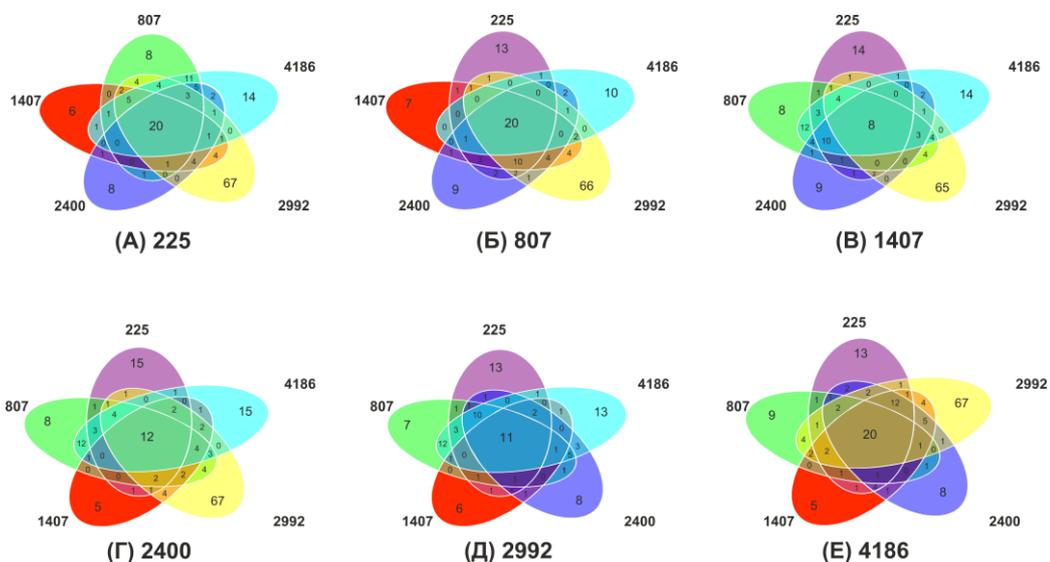


Рис. 6. Диаграммы Венна для парных сравнений геномов изолятов одного сиквенс-типа с геномами изолятов пяти других сиквенс-типов. Референсные сиквенс-типы: 225 (А), 807 (Б), 1407 (В), 2400 (Г), 2992 (Д) и 4186 (Е). Цифрами указано число генов, присутствующих в 80% и более изолятов референсного сиквенс-типа и не обнаруженных либо найденных у менее чем 28% изолятов другого сиквенс-типа. В центре каждой диаграммы указано число генов, которые характерны для рассматриваемого сиквенс-типа и являются минорными компонентами у пяти других сиквенс-типов.

Особый интерес представляло парное сравнение геномов наиболее распространенного в РФ NG-MAST типа 807 с наиболее распространенным в мире NG-MAST типом 1407.

Сравнение геномов изолятов сиквенс-типа 807 с геномами изолятов других сиквенс-типов (**Рис. 8/Б**) показало, что:

- 7 генов отсутствовали или являлись минорными компонентами в изолятах сиквенс-типа 1407, но присутствовали у изолятов пяти других сиквенс-типов;
- 19 генов, которые характерны для сиквенс-типа 807, но являлись минорными компонентами у пяти других сиквенс-типов.

Характерные гены для этих сиквенс-типов представлены в (**Таблице 1**).

Таблица 1. Гены, характерные для анализируемых сиквенс-типов, и функции кодируемых ими белков.

а) сиквенс-тип 807

<i>Характерные гены</i>	<i>Белки и их функции</i>
NEIS0831 (<i>pilX</i>)	Минорный компонент пилина**
NEIS0827 (<i>pilH/ fimT</i>)	Белок сборки пилей
NEIS0828 (<i>pilI</i>)	Белок модификации пилина
NEIS0829 (<i>pilJ</i>)	Белок биогенеза, вариант аллели (IV)**
NEIS2083 (<i>mafA</i>)	Липопротеин/адгезин
NEIS2273(<i>traG</i>)	Сборка пилина; транспортный белок, компонент GGI*
NEIS2311(<i>eppA</i>)	Компонент GGI
NEIS2016	Металлопептидаза семейства M48
NEIS1439	Белок семейства термонуклеаз
NEIS1310 (<i>modA</i>)	Сайт-специфическая ДНК-метилтрансфераза
NEIS0263	Белок семейства ComF
NEIS3174	Белок вирулентности АТФазы семейства AAA**
NEIS0916	Липопротеин/адгезин*
NEIS2312 (<i>ychI</i>)	Компонент GGI
NEIS0595	Гипотетические белки
NEIS2078	
NEIS1241 (<i>adhC</i>)	
NEIS0535	
NEIS2979	

б) сиквенс-тип 1407

<i>Характерные гены</i>	<i>Белки и их функции</i>
<i>pilS</i>	Компонент пилина
NEIS0210 (<i>pilE</i>)	Фимбриальный белок/пилин*
NEIS1719(<i>opaA</i>)	Белок наружной мембраны/мутности*
NEIS1753 (<i>penA</i>)	Пенициллин-связывающий белок 2
NEIS0593	Эндонуклеаза HNH, полиморфный токсин семейства MafB
NEIS1876	Гипотетические белки
NEIS1929	

*Ближайшее совпадение, ** точное совпадение

Среди характерных генов нами были обнаружены компоненты гонококкового острова - системы секреции ДНК IV типа. Далее мы более подробно рассмотрели различия в структуре гонококковых островов у изолятов *N. gonorrhoeae* сиквенс-типов 807 и 1407 (Таблица 2).

Таблица 2. Различия в структуре гонококкового острова у изолятов *N. gonorrhoeae* анализируемых NG-MAST типов.

а) сиквенс-тип 1407

Наличие GGI	Аллели GGI по номенклатуре Pubmlst с выявленными изменениями в нуклеотидной последовательности. Выделены ключевые для секреции ДНК гены.
24 образца из 25	<ul style="list-style-type: none"> • <i>traV</i>: 30% поломка гена (у одного образца); • <i>traU</i>: 2 аллель, но с заменой 703A→G (у одного образца)

б) сиквенс-тип 807

Наличие GGI	Аллели GGI по номенклатуре Pubmlst с выявленными изменениями в нуклеотидной последовательности. Выделены ключевые для секреции ДНК гены.
25 образцов из 25	<ul style="list-style-type: none"> • <i>traD</i>: 15 аллель, но с заменой 1256-1257 del (TTTG) (сдвиг рамки) (у 2-х образцов), 337 G→A (у 2-х образцов), 935C→T (у 5-ти образцов), 1399 G→A (у одного образца); • <i>traC</i>: 1 аллель, но с заменой 1842C →A (у одного образца); • <i>trbC</i>: 26 аллель, но с заменой 321T→C (у 5-ти образцов); • <i>traH</i>: 34 аллель, но с заменой 1403A→C (у одного образца); • <i>traG</i>: 47 аллель, но с заменой 1195C→T (у 4-х образцов), 49 аллель, но с заменой 861T→C & 865G →T (у 7 образцов); • <i>atIA</i>: заменен на ген <i>eppA</i> (у всех образцов); • <i>parB</i>: 16 аллель, но с заменой 363C→T (у 5-ти образцов)

Для изолятов из геногруппы 807 выявлены значительные изменения в существенных и несущественных для функционирования GGI генах. Ключевым выявленным изменением является замена существенного гена *atIA* на *eppA*, которая произошла у всех 25 изолятов одновременно с заменой гена *uch* на *uch1* и потерей гена *exp1*. У некоторых изолятов сиквенс-типа 807 произошло также изменение аллели гена *traG*. Такие изменения не могут не привести к потере способности к секреции ДНК (Pachulec et al., 2014). Интересно отметить, что хотя функцией белков, кодируемых генами *atIA* (автолизин А) и *eppA* (эндопептидаза), является расщепление пептидогликановой оболочки при формировании отверстия в клеточной стенке бактерии для установки аппарата T4SS, белок EppA по неустановленной пока причине не может заменить собой AtIA. Для изолятов сиквенс-типа 1407 обнаружено небольшое число изменений как в существенных, так и в несущественных генах, однако все изменения наблюдаются лишь в одном или в двух образцах из 25.

Таким образом сравнительный полногеномный анализ показал что специфичные гены и их аллели для геногруппы 807, как правило, относятся к адгезинам, пияям, белкам мутности, системам рестрикции-модификации, транскрипции, трансляции и репликации, тогда как к характерным генам у изолятов из геногруппы 1407 относится в первую очередь мозаичный ген *penA*, ассоциированный с устойчивостью к цефалоспорином III поколения, и компоненты гонококкового острова, позволяющие *N. gonorrhoeae* осуществлять секрецию ДНК.

Разработка метода идентификации генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам на основе гидрогелевого биочипа

Разработан биочип для идентификации генетических детерминант лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам различных классов, в первую очередь к β -лактамам. Схема размещения элементов с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами для идентификации мутаций, ассоциированных с резистентностью *N. gonorrhoeae* к лекарственным препаратам, приведена на **Рис. 7**.



Рис. 7. Схема биочипа для определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью *N. gonorrhoeae* к β -лактамам антимикробным препаратам, а также другим классам АМП.

Аналитическая чувствительность микрочипа, которая определялась путем анализа продуктов ПЦР, полученных из серийных разведений геномной ДНК, составила ~500 геномных эквивалентов на реакцию. С помощью сконструированного биочипа были проанализированы клинические изоляты *N. gonorrhoeae*, собранные на территории РФ в период 2016-2021 годов (648 изолятов).

Примеры флуоресцентных изображений (гибридизационные картины) микрочипов после проведения анализа показаны на **Рис. 8**.

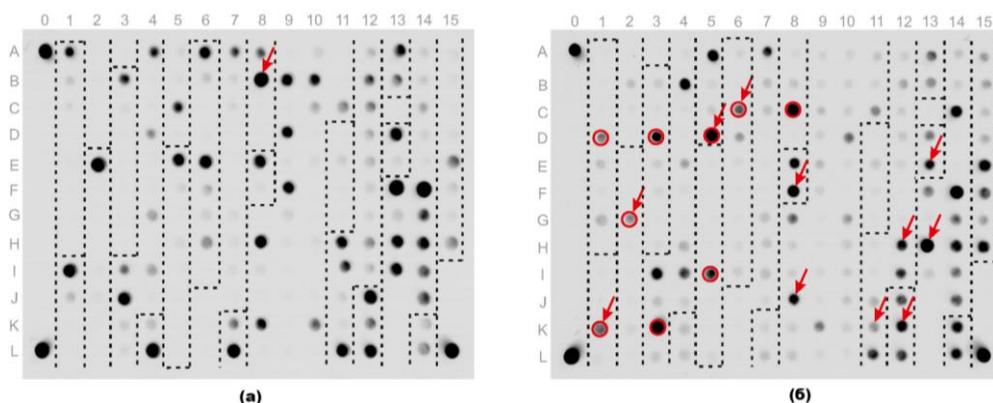


Рис 8. Гибридизационные картины микрочипов после анализа ДНК клинических изолятов *N. gonorrhoeae*. Группы элементов (соответствуют матрице на Рис. 7) выделены пунктирными линиями. Элементы с обнаруженными мутациями отмечены стрелками, элементы с мозаичными аллелями *repA* обведены красным.

(а) Изолят, из наиболее часто встречающейся в РФ геногруппы G807, несущий немозаичный ген *penA* со вставкой Asp в положении 345-346 (элемент В-8);

(б) Изолят, из пандемически значимой геногруппы G1407, несущий:

- мозаичный ген *penA* с заменами Pe-312→Met, Val-316→Thr, Asn-512→Tyr, Gly-545→Ser (максимальные сигналы в элементах D-1, К-1, G-2, D-3, К-3, D-5, I-5, С-6, С-8; а также замены в генах *ponA*, *porB*, *gyrA*, *parC*, *rpsJ*, *mtrR*, ассоциированных со снижением чувствительности к другим классам АМП.

Изолят действительно демонстрировал уменьшение чувствительности к цефтриаксону; измеренное МПК_{цеф} = 0,12 мг/л находится на границе между чувствительными и устойчивыми штаммами, согласно критериям МУК 4.2.1890-04 и EUCAST.

Оценка вклада генетических детерминант устойчивости к β-лактамам в уровень фенотипической чувствительности изолятов *N. gonorrhoeae*.

Анализ устойчивости к цефтриаксону

По результатам анализа 648 клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных в РФ в период 2016-2021 годов, построены мутационные профили генов *N. gonorrhoeae*, ассоциированные с чувствительностью к цефтриаксону (Рис. 9).

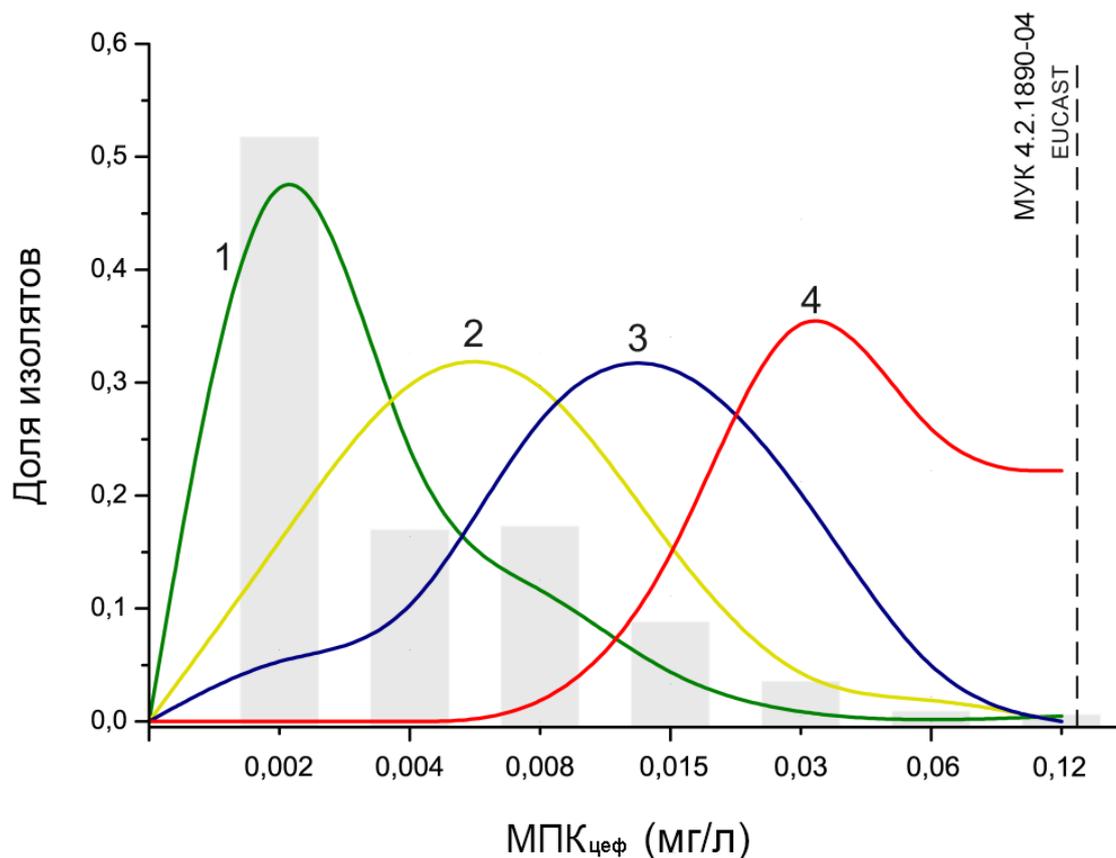


Рис. 9 Распределение изолятов *N. gonorrhoeae* с различными мутационными профилями по МПК цефтриаксона. Сплошные линии на графиках отражают долю изолятов с данным МПК от количества изолятов данного профиля. Серые столбики показывают долю изолятов с данным МПК от общего количества изолятов. Вертикальными линиями отмечена граница между чувствительными и устойчивыми изолятами, согласно критериям МУК 4.2.1890-04 и EUCAST.

При исследовании влияния мутаций на устойчивость к цефтриаксону проводили анализ генетических детерминант, в генах *penA*, *ponA*, *porB* и *mtrR*. Всего было выявлено четыре основных мутационных профиля, характеризующие чувствительность к цефтриаксону в российской популяции (**Рис 9**):

- 1) *penA*, *porB* (wt) и *penA* (insAsp345), *porB* (wt);
- 2) *penA* (insAsp345), (542Ser), *porB* (wt) и *penA* (insAsp345), *porB* (120Lys), (121Asp/Asn);
- 3) *penA* (insAsp345), (542Ser), *porB* (120Lys/Thr/Asn/Asp), (121Gly/Asp/Asn);
- 4) **мозаичный ген *penA*** (312Met, 316Thr, 512Tyr, 545Ser), *porB* (wt) и **мозаичный ген *penA*, *porB*** (120Lys/Asp), (121Gly/Asn).

Наиболее значимым оказался вклад мозаичного гена *penA*. Изоляты с мозаичным геном *penA* составляли порядка 1% процента от всей выборки, однако характеризовались значениями МПК цефтриаксона до 0,12 мг/л, что является пограничным значением МПК по критерию МУК 4.2.1890-04 и EUCAST.

В целом российская популяция гонококка оказалась чувствительна к цефтриаксону, что подтверждает выбор цефалоспоринов III поколения в качестве основного препарата выбора для терапии гонококковой инфекции. Таким образом, распространение устойчивости к цефалоспорином III поколения, наблюдаемое в Европе (Golparian et al., 2022), пока не характерно для российской популяции *N. gonorrhoeae*. Однако трансграничный перенос и продолжающийся селективный отбор резистентных к цефалоспорином изолятов уже в ближайшем будущем могут привести к необходимости введения и в России комбинированной (цефтриаксон + азитромицин) антимикробной терапии для лечения гонореи. Также в скором времени воздействие накопленных мутаций может привести к прогрессирующему снижению чувствительности к цефалоспорином, что может повысить значимость анализа таких мутаций в ближайшем будущем.

Анализ устойчивости к пенициллину

Пенициллин долгое время не используется для терапии гонококковой инфекции, однако кумулятивный эффект накопленных мутаций в детерминантах устойчивости к пенициллину может вести к прогрессирующему снижению чувствительности ко всем β -лактамам, включая цефалоспорины III поколения. Это подтверждает значимость анализа генетических детерминант лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* к пенициллинам.

При исследовании влияния мутаций на устойчивость к пенициллину проводили анализ генетических детерминант в генах *penA*, *ponA*, *porB* и *mtrR*, а также детектировали наличие или отсутствие гена *bla*, локализованного на плазмиде *bla*_{ТЕМ} (**Рис 10**).

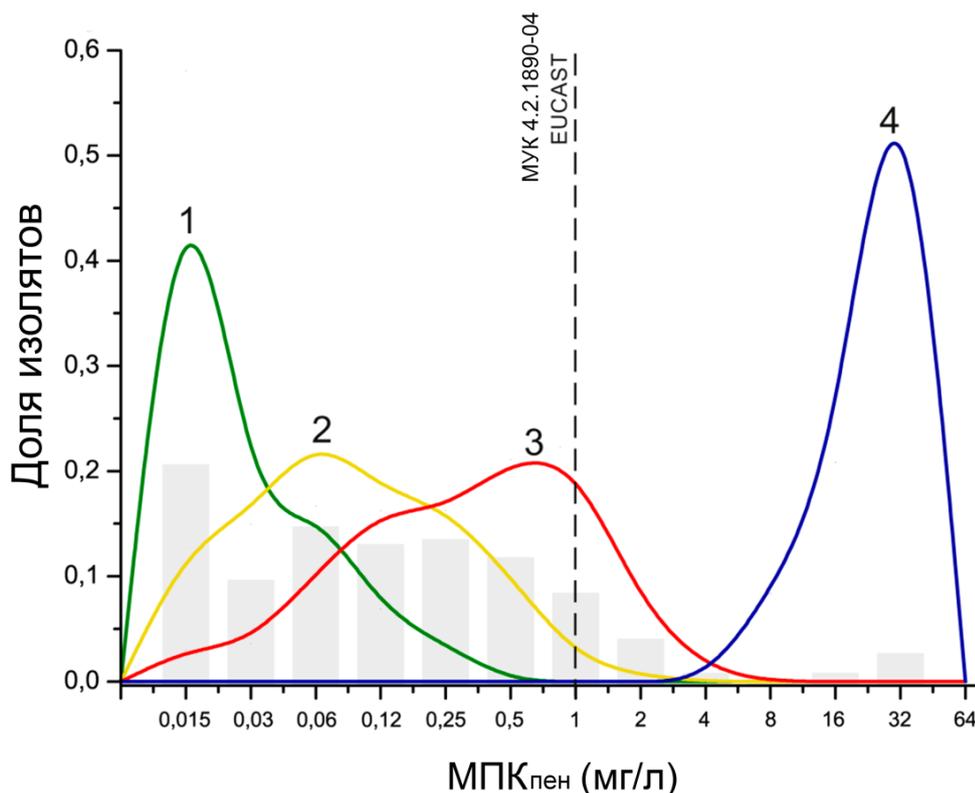


Рис. 10 Распределение изолятов *N. gonorrhoeae* с различными мутационными профилями по МПК пенициллина. Сплошные линии на графиках отражают долю изолятов с данным МПК от количества изолятов данного профиля. Серые столбики показывают долю изолятов с данным МПК от общего количества изолятов. Вертикальными линиями отмечена граница между чувствительными и устойчивыми изолятами согласно критериям ММК 4.2.1890-04 и EUCAST.

Всего было выявлено четыре основных мутационных профиля, характеризующих чувствительность или устойчивость *N. gonorrhoeae* к пенициллину в российской популяции (**Рис 10**):

- 1) *penA*, *ponA*, *porB*, *mtrR* (wt) и *penA*, *ponA* (wt), *porB* (120Lys/Asn/Asp), (121Asp), *mtrR* (-35delA);
- 2) *penA* (insAsp345), *ponA*, *porB*, *mtrR* (wt) и *penA* (insAsp345), *porB* (120Lys/Asn), (121Gly/Asp), *ponA*, *mtrR* (wt);
- 3) *penA* (insAsp345), *ponA* (421Pro), *porB*, *mtrR* (wt) и *penA* (insAsp345), *ponA* (421Pro), *porB* (wt), *mtrR* (-35delA) и *penA* (insAsp345), *ponA* (421Pro), *porB* (120Lys/Asp), (121Gly/Asn/Asp), *mtrR* (-35delA);
- 4) Наличие плазмиды *bla*_{TEM}

В изолятах со сниженной чувствительностью к пенициллину обнаружены хромосомные детерминанты устойчивости (1,2,3 мутационные профили (**Рис. 10**)): это инсерция аспартата в 345-346 положении пенициллинсвязывающего белка 2 (insAsp345), замена Leu421Pro в гене *ponA*, мутации в гене белка PorB1b и промоторном участке гена *mtrR*.

В формирование резистентности к пенициллинам отмечен вклад мутаций в гене *porB*. Наибольшее число изолятов для мутационных профилей 1, 2 и 3 соответствовало значениям МПК 0,25 мг/л и 0,5 мг/л, что, наряду с повышением уровня устойчивости, свидетельствует о большом влиянии мутации Gly120Lys при

формировании устойчивости к пенициллину. Самые устойчивые изоляты имели β-лактамазы. Присутствие этого фермента вызывает значительное повышение уровня устойчивости к пенициллинам ($MPK_{пен} \geq 16$ мг/л) по сравнению с хромосомными мутациями ($MPK_{пен} = 0,12-1$ мг/л) (4 мутационный профиль (Рис. 10)).

Создание метода предсказания устойчивости *N. gonorrhoeae* к цефтриаксону и пенициллину

Для построения регрессионных моделей использовали выборку изолятов из базы данных Pathogenwatch (5631 изолят), а также изоляты собранные на территории Российской Федерации (181 изолят). Поскольку цефтриаксон является препаратом выбора для терапии гонококковой инфекции как в России, так и большинстве стран мира, выборка изолятов была сформирована из разных регионов мира, включая редкие генетические паттерны, обуславливающие высокий уровень устойчивости к цефтриаксону. Это позволило определить статистическую связь между генетическими мутациями и экспериментально полученными значениям МПК цефтриаксона (Рис. 11).

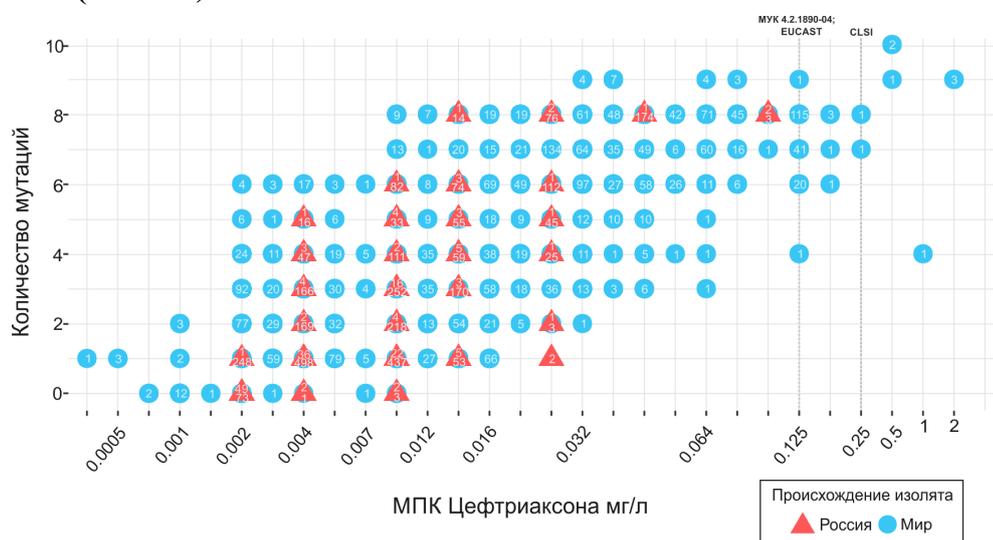


Рис. 11. Диаграмма распределения количества изолятов *N. gonorrhoeae* в зависимости от уровня их фенотипической чувствительности.

Таким образом, для построения регрессионных моделей на основе данных для 5812 изолятов *N. gonorrhoeae* исходно было использовано 26 хромосомных и плазмидных детерминант, потенциально значимых для определения уровня чувствительности к цефтриаксону и пенициллину:

- мутации в PBP2 (ген *penA*) Ala-311→Val, Ile-311→Met, Val-316→Thr, insAsp(345-346), Thr-483→Ser, Ala-501→Pro, Ala-501→Thr, Ala-501→Val, Asn-512→Tyr, Gly-542→Ser, Gly-545→Ser, Pro-551→Leu; Pro-551→Ser;
- мутация в PBP1 (ген *ponA*) Leu-421→Pro;
- мутация в белке-порине PorB1b (ген *porB*) Gly-120→Asn, Gly-120→Asp, Gly-120→Lys, Gly-120→Arg, Ala-121→Gly, Ala-121→Ser, Ala-121→Asp, Ala-121→Asn, Ala-121→Val, Ala-121→Arg;
- -35delA делеция аденина в промоторной области гена *mtrR*;
- присутствие *bla*_{TEM} плазмиды.

В результате получили, что для предсказания МПК изолятов *N. gonorrhoeae* к цефтриаксону оптимальной оказывается регрессионная модель, включающая 20 параметров.

$$\log_2 \text{МПК}_{\text{цеф}} = -8.993 + (3,340 \times \text{Ala-311} \rightarrow \text{Val}) + (1,268 \times \text{Ile-312} \rightarrow \text{Met}) + (1,386 \times \text{insAsp345-346}) + (1,312 \times \text{Ala-501} \rightarrow \text{Val}) + (0,717 \times \text{Ala-501} \rightarrow \text{Thr}) + (5,203 \times \text{Ala-501} \rightarrow \text{Pro}) + (0,711 \times \text{Asn-512} \rightarrow \text{Tyr}) + (1,277 \times \text{Gly-542} \rightarrow \text{Ser}) + (1,468 \times \text{Gly-545} \rightarrow \text{Ser}) + (0,757 \times \text{Pro-551} \rightarrow \text{Leu}) + (1,033 \times \text{Pro-551} \rightarrow \text{Ser}) + (0,095 \times \text{Leu-421} \rightarrow \text{Pro}) + (0,638 \times \text{Gly-120} \rightarrow \text{Asn}) + (0,521 \times \text{Gly-120} \rightarrow \text{Asp}) + (1,248 \times \text{Gly-120} \rightarrow \text{Lys}) + (2,466 \times \text{Gly-120} \rightarrow \text{Arg}) - (0,313 \times \text{Ala-121} \rightarrow \text{Gly}) + (0,227 \times \text{Ala-121} \rightarrow \text{Ser}) - (0,137 \times \text{Ala-121} \rightarrow \text{Asp}) - (0,997 \times \text{Ala-121} \rightarrow \text{Val})$$

Регрессионный анализ показал, что наибольший вклад в увеличение МПК цефтриаксона вносят мутации в гене *penA*, приводящие к заменам Ala-501→Pro и Ala-311→Val, и в гене *porB*, приводящие к замене Gly-120→Arg. Другие замены в этих позициях: Ala-501 в PBP2 на Thr и Val и Gly-120 в PorB на Asn, Asp и Lys, имеют меньший эффект.

С помощью регрессионного анализа нами также определен вклад генетических детерминант в уровень устойчивости изолятов *N. gonorrhoeae* к пенициллину. Результаты регрессионного анализа для предсказания МПК_{пен} описываются следующим уравнением:

$$\log_2 \text{МПК}_{\text{пен}} = -5.059 + (2,286 \times \text{insAsp(345-346)}) + (1,142 \times \text{Ala-501} \rightarrow \text{Val}) - (-1,440 \times \text{Ala-501} \rightarrow \text{Thr}) + (1,278 \times \text{Phe-504} \rightarrow \text{Leu}) - (-1,696 \times \text{Pro-551} \rightarrow \text{Leu}) + (0,935 \times \text{Leu-421} \rightarrow \text{Pro}) + (2,213 \times \text{Gly-120} \rightarrow \text{Lys/Asp}) + (1,553 \times -35\text{delA}) + (6,417 \times \text{bla}_{\text{TEM}})$$

Наибольший вклад в повышение МПК_{пен} вносит наличие плазмиды *bla*_{TEM}. Также значимое влияние оказывают замены остатка 120 в белке-порине PorB, в PBP2: ins345Asp, замена Ala501Val в PBP2 (аллель *penA* немозаичного типа), замена Phe504Leu в PBP2 (аллели *penA* как мозаичного, так и немозаичного типов), а также мутация в промоторной области гена *mtrR*.

Для оценки полученной регрессионной модели, по полученным уравнениям были рассчитаны значения МПК_{цеф} и МПК_{пен} у 14 референсных штаммов ВОЗ, для которых известны детерминанты резистентности к β-лактамам антибиотикам. Рассчитанные по уравнениям значения МПК_{цеф} и МПК_{пен} округляли до значения, соответствующего ближайшему двукратному серийному разведению. Для 11 штаммов из 14 рассчитанные значения МПК соответствовали измеренным значениям, два штамма показали значения МПК в пределах одного двукратного разведения, один штамм – в пределах двух двукратных разведений в сторону уменьшения предсказанного значения.

Разработка генно-инженерных клеточных моделей *N. gonorrhoeae* для оценки устойчивости патогена к препаратам β-лактамного ряда.

Для оценки устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам антибиотикам, включая цефалоспорины III поколения, и моделирования последствий единичных нуклеотидных замен для часто встречающихся изолятов, было получено три плазмиды размером 5154 п.о., отличающиеся структурой гена *bla*:

- *pbla*_{TEM-1} – нет мутаций в кодонах 182 и 238;
- *pbla*_{TEM-135} – замена ATG→ACG в кодоне 182, т.е. только замена Met182Thr,
- *pbla*_{TEM-20} – замена ATG→ACG в кодоне 182, т.е. замена Met182Thr, и замена GGT→AGT кодоне 238, т.е. замена Gly238Ser; кодирует β-лактамазу расширенного спектра действия.

Исследована резистентность полученных штаммов *N. gonorrhoeae* и *E. coli*, содержащих плазмиды *pbla*_{ТЕМ}, к нескольким группам β-лактамовых антибиотиков: пенициллины (ранее использовались для терапии гонококковой инфекции), цефалоспорины (используются для лечения гонореи в настоящее время), а также карбапенемы, которые, возможно, заменят цефалоспорины при распространении устойчивости к цефалоспорином (Unemo et al., 2020). Измеренные МПК для этих препаратов приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Устойчивость *N. gonorrhoeae* к β-лактамовым антибиотикам, содержащих разные плазмиды *pbla*_{ТЕМ}.

Антибиотик	МПК <i>N. gonorrhoeae</i> (мг/л)			
	<i>WT</i> _{ATCC 49226}	<i>pbla</i> _{ТЕМ-1}	<i>pbla</i> _{ТЕМ-135}	<i>pbla</i> _{ТЕМ-20}
Пенициллин (PEN)	0,25 (Ч)	16 (У)	32 (У)	16 (У)
Ампициллин (AMP)	0,125	8	8	16
Цефтриаксон (CRO)	0,03 (Ч)	0,015 (Ч)	0,03 (Ч)	4 (У)
Цефиксим (CFM)	0,015 (Ч)	0,015 (Ч)	0,015 (Ч)	16 (У)
Цефотаксим (CTX)	0,015 (Ч)	0,008 (Ч)	0,015 (Ч)	8 (У)
Цефуоксим (СХМ)	0,008	0,004	0,004	2
Цефепим (FEP)	0,03	0,015	0,015	16
Меропенем (MEM)	0,002	0,002	0,002	0,004
Имипенем (IPM)	0,004	0,008	0,004	0,008
Дорипенем (DOR)	0,002	0,002	0,002	0,002

После трансформации бактерий *N. gonorrhoeae* дикого типа плазмидными векторами *pbla*_{ТЕМ-1} и *pbla*_{ТЕМ-135}, содержащими гены β-лактамазы широкого спектра действия (обычную пенициллиназу), у бактерий наблюдалось резкое снижение чувствительности к пенициллинам (МПК_{пен} = 16 мг/л, МПК_{амп} = 32 мг/л). Также оценка устойчивости полученных штаммов с плазмидами к β-лактамам показала, что ни один из полученных вариантов β-лактамаз, включая β-лактамазу расширенного спектра ТЕМ-20, не способен гидролизовать карбапенемы.

Полученные МПК штамма, содержащего плазмиду *pbla*_{ТЕМ-20}, показывают, что β-лактамаза ТЕМ-20 является лактамазой расширенного спектра действия, которая обладает способностью гидролизовать как пенициллины, так и цефалоспорины разных поколений. МПК к цефалоспорином оказались выше порогового значения для чувствительных (Ч) / устойчивых (У) штаммов, составляющего 0,125 мг/л. Таким образом, уровень устойчивости штамма с плазмидой *pbla*_{ТЕМ-20} выше порогового значения, установленного для цефалоспоринов III и IV поколения, более, чем на пятикратное разбавление антибиотика.

Для всех полученных штаммов были измерены характеристики жизнеспособности. Нами проведен подсчет колониеобразующие единиц (КОЕ) *N. gonorrhoeae*, на твердых средах с присутствием и без добавления цефтриаксона и построены кинетические кривые роста и гибели клеток *N. gonorrhoeae*, несущих плазмиды *pbla*_{ТЕМ-1}, *pbla*_{ТЕМ-135} и *pbla*_{ТЕМ-20} (Рис. 12).

Без добавления цефтриаксона штамм дикого типа и штаммы, несущие плазмиды *pbla*_{ТЕМ-1} и *pbla*_{ТЕМ-135}, демонстрировали рост в течение 8 часов культивирования. В отличие от них количество жизнеспособных клеток

N. gonorrhoeae, несущих плазмиду $pbla_{\text{TEM-20}}$, начинало снижаться через 6 часов культивирования.

На средах с цефтриаксоном результаты исследований кривых роста показывают, что гибель клеток *N. gonorrhoeae* в присутствии цефтриаксона происходит для различных штаммов по-разному, причем в штамме, не несущем плазмиды $pbla_{\text{TEM}}$, клетки погибают несколько быстрее, чем в штаммах с плазмидами $pbla_{\text{TEM-1}}$ и $pbla_{\text{TEM-135}}$, несмотря на то, что экспрессируемые этими плазмидами β -лактамазы не способны разрушать цефалоспорины. Особо стоит отметить, что у штаммов с плазмидой $pbla_{\text{TEM-20}}$ при концентрации цефтриаксона 0,03 - 0,125 мг/л в первые 3 часа наблюдалось некоторое снижение количества живых клеток, затем кратковременное повышение КОЕ в период с 3 по 6 час, которое далее переходило в сокращение КОЕ, аналогичное таковому у штамма *N. gonorrhoeae* с плазмидой $pbla_{\text{TEM-20}}$ при его культивировании в отсутствие антибиотика.

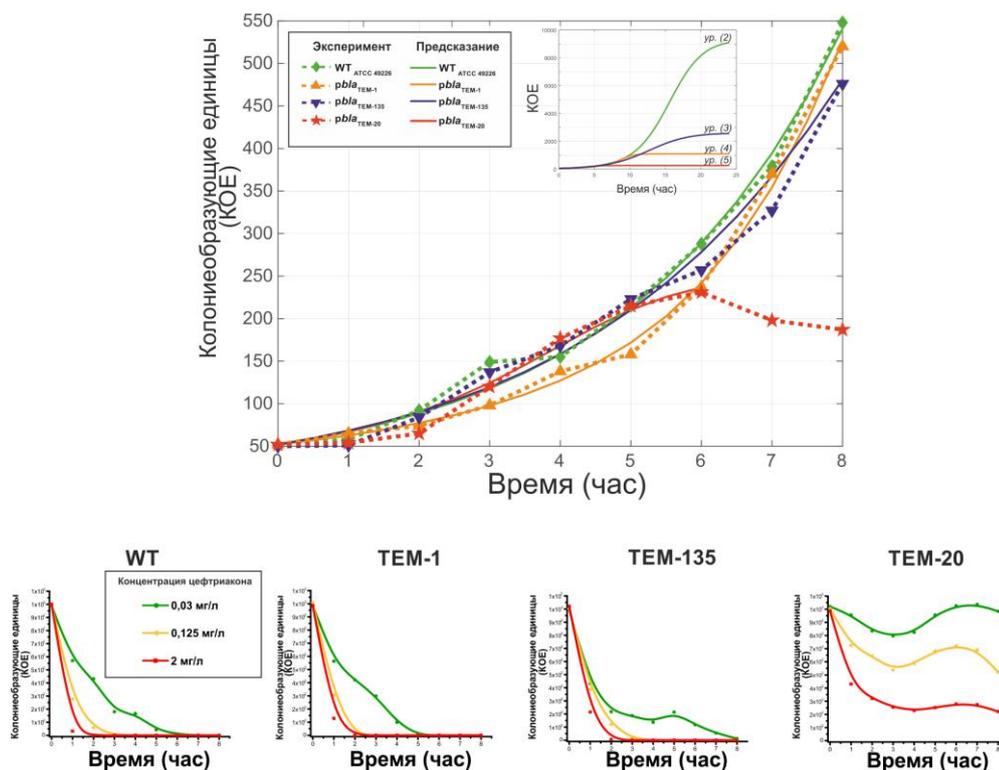


Рис. 12. Кривые роста и гибели (изменение КОЕ во времени) штамма *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, не несущего плазмиды (WT) и несущего плазмиды $pbla_{\text{TEM}}$.

Продемонстрированная сниженная жизнеспособность клеток с плазмидами может быть объяснена двумя причинами: (а) наличие самой плазмиды требует от клеток дополнительных затрат на ее репликацию и (б) экспрессия β -лактамазы расширенного спектра действия влияет на жизнеспособность. Механизм действия цефалоспоринов, как и всех β -лактамов, направлен на ингибирование синтеза клеточной стенки бактерий путем ковалентного ингибирования транспептидаз, пенициллинсвязывающих белков. Пептидогликан грамотрицательных бактерий имеет схожий с β -лактамами препаратами С-концевой мотив Acyl-D-Ala-D-Ala пептидной цепи. Вероятно, из-за сходства компонентов клеточной стенки и цефалоспоринов экспрессия β -лактамазы может вызывать изменения в составе пептидогликана, тем самым снижая жизнеспособность бактерии.

Выводы

1. Выявлены доминирующие в России молекулярные генотипы *N. gonorrhoeae* и обнаружена функциональная зависимость между генотипами и аллелями гена *penA*, являющейся основной детерминантой резистентности патогена к β -лактамам.

2. Филогенетический анализ изолятов показал генетическую отдалённость наиболее распространенных российских и европейских молекулярных типов, что указывает на локальный характер формирования и эволюции российской популяции возбудителя гонококковой инфекции.

3. Проведено полногеномное секвенирование 25 клинических изолятов РФ из геногруппы 807 с использованием двух NGS платформ, *de novo* собраны 25 геномов. На основе полученных данных проведен сравнительный полногеномный анализ наиболее часто встречающихся изолятов *N. gonorrhoeae* в России и в мире, различающихся профилями устойчивости к АМП. Для каждого сиквенс-типа установлены характерные гены, являющиеся возможными маркерами адаптивного преимущества. Для преобладающих в России и мире генетических линий *N. gonorrhoeae* выявлены различия в составе гонококковых островов – системы секреции ДНК IV типа.

4. Разработан метод на основе гидрогелевого биочипа для идентификации генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам различных классов. Метод валидирован с использованием 648 клинических изолятов, собранных в 2016 – 2021 гг. С использованием разработанного метода выявлены генетические профили детерминант устойчивости к β -лактамам антибиотикам.

5. Разработан и апробирован метод определения МПК цефтриаксона и пенициллина на основе биочипа и регрессионных уравнений.

6. Разработана генно-инженерная клеточная модель, позволяющая проводить оценку устойчивости *N. gonorrhoeae* к β -лактамам антибиотикам, включая пенициллины и цефалоспорины разных поколений. *In vitro* показано, что жизнеспособность *N. gonorrhoeae* с β -лактамазой TEM₂₀ – цефалоспоринозой способной возникнуть в результате единичной нуклеотидной замены у широко циркулирующей в природе пенициллиназы TEM₁₃₅, существенно снижена, что возможно объясняет отсутствие таких изолятов в природе.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Shaskolskiy B., Kravtsov D., **Kandinov I.**, Dementieva E., Gryadunov D. Genomic Diversity and Chromosomal Rearrangements in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. / *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. 23(24): 15644.
2. Shaskolskiy B., **Kandinov I.**, Dementieva E., Gryadunov D. Antibiotic Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Challenges in Research and Treatment. / *Microorganisms*. 2022. 10(9), 1699.
3. **Kandinov I.**, Gryadunov D., Vinokurova A., Antonova O., Kubanov A., Solomka V., Shagabieva J., Deryabin D., Shaskolskiy B. *In vitro* susceptibility to β -lactam antibiotics and viability of *Neisseria gonorrhoeae* strains producing plasmid-mediated broad- and extended-spectrum β -lactamases. / *Frontiers in microbiology*. 2022. 13: 896607.
4. Shaskolskiy B., Kravtsov D., **Kandinov I.**, Gorshkova S., Kubanov A., Solomka V., Deryabin D., Dementieva E., Gryadunov D. Comparative whole-genome analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates revealed changes in the gonococcal genetic island and specific genes as a link to antimicrobial resistance. / *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022. 12: 831336.
5. Shaskolskiy B., **Kandinov I.**, Kravtsov D., Vinokurova A., Gorshkova S., Filippova M., Kubanov A., Solomka V., Deryabin D., Dementieva E. and Gryadunov D. Hydrogel Droplet Microarray for Genotyping Antimicrobial Resistance Determinants in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates. / *Polymers*. 2021, 13, 22, 3889.
6. Shaskolskiy B., **Kandinov I.**, Kravtsov D., Filippova M., Chestkov A., Solomka V., Kubanov A., Deryabin D., Dementieva E., Gryadunov D. Prediction of ceftriaxone MIC in *Neisseria gonorrhoeae* using DNA microarray technology and regression analysis. / *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021. 76(12), p. 3151-3158.
7. **Kandinov I.**, Dementieva E., Kravtsov D., Chestkov A., Kubanov A., Solomka V., Deryabin D., Gryadunov D., Shaskolskiy B. Molecular Typing of *Neisseria gonorrhoeae* Clinical Isolates in Russia, 2018–2019: A Link Between *penA* Alleles and NG-MAST Types. / *Pathogens*. 2020. 9: 941.
8. Шаскольский Б.Л., **Кандинов И.Д.**, Честков А.В., Соломка В.С., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г., Грядун Д.А., Дементьева Е.И. Сравнительный филогенетический анализ клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae* России, стран Евросоюза и Японии. / *Вестник РГМУ*. 2020. № 1. С. 5-13.
9. Shaskolskiy B., Dementieva E., **Kandinov I.**, Chestkov A., Kubanov A., Deryabin D., Gryadunov D. Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence types in Russia and Europe. / *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. 93: 1-8.
10. Shaskolskiy B., Dementieva E., **Kandinov I.**, Filippova M., Petrova N., Plakhova X., Chestkov A., Kubanov A., Deryabin D., Gryadunov D. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin and ceftriaxone) in Russia, 2015–2017. / *PLoS One*. 2019. 14(7): e0220339.

Патенты

1. Грядунов Д.А., Дементьева Е.И., **Кандинов И.Д.**, Кравцов Д.В., Шаскольский Б.Л., Честков А.В., Соломка В.С., Кубанов А.А. Способ идентификации мутаций в гене пенициллинсвязывающего белка 2 *penA Neisseria gonorrhoeae*, приводящих к устойчивости к бета-лактамам антибиотикам, на биологических микрочипах. Патент РФ № 2741099. Приоритет от 30.06.2020 г. Опубликовано 22.01.2021.

2. **Кандинов И.Д.**, Антонова О.В., Грядунов Д.А., Дементьева Е.И., Шаскольский Б.Л., Кубанов А.А., Соломка В.С., Дерябин Д.Г. Плазмидный вектор *pESB* для оценки устойчивости *Neisseria gonorrhoeae* к бета-лактамам антибиотикам и способ его конструирования. Патент РФ №. 2787047. Приоритет от 06.12.2021 г. Опубликовано 28.12.2022.

Тезисы докладов и выступления на научных конференциях

1. **Кандинов И.Д.**, Винокурова А.С., Антонова О.В., Шаскольский Б.Л., Грядунов Д.А. Клеточные модели *N. gonorrhoeae* с β -лактамазой расширенного спектра действия. В книге: VIII Пущинская конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов". Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов "Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие". Москва, 2022, сб. тезисов, с. 145-147. ISBN 978-5-89118-859-4

2. Горшкова С.А., Шаскольский Б.Л., **Кандинов И.Д.**, Дементьева Е.И., Кравцов Д.В., Винокурова А.С., Грядунов Д.А. Полногеномный анализ субпопуляций *Neisseria gonorrhoeae*. Конференция молодых ученых «Геномика, метагеномика и молекулярная биология микроорганизмов». Сколтех, 19-20 ноября 2022, сб. тезисов, с. 15.

3. **Кандинов И.Д.**, Шаскольский Б.Л., Грядунов Д.А. Клеточные модели – новые инструменты исследования устойчивости *Neisseria gonorrhoeae* к антимикробным препаратам. XXII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов. Москва, 2022 20-23 сентября.

4. **Кандинов И.Д.**, Кравцов Д.В., Винокурова А.С., Горшкова С.А., Шаскольский Б.Л., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А. Полногеномный анализ *Neisseria gonorrhoeae* и устойчивость к антимикробным препаратам. III Всероссийская конференция "Высокопроизводительное секвенирование в геномике". Новосибирск, 19-24 июня 2022. Сб. тезисов, с. 51. ISBN 978-5-6047686-0-0

5. **Кандинов И.Д.**, Кравцов Д.В., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А., Шаскольский Б.Л., Кубанов А.А., Комягина Т.М., Дерябин Д.Г. *Neisseria gonorrhoeae*: генетическое разнообразие и устойчивость к антимикробным препаратам в России и в мире. XXXIII зимняя международная молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии Москва, 8-11 февраля 2021 г. Сб. тезисов, с. 203.

6. Шаскольский Б.Л., **Кандинов И.Д.**, Кравцов Д.В., Дементьева Е.И., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А., Грядунов Д.А. Устойчивость к антимикробным препаратам и генетическое разнообразие *Neisseria gonorrhoeae* в России и мире. XXI Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов. Москва, 7-10 сентября 2021 г. Сб. тезисов. с. 7-8.

7. Шаскольский Б.Л., **Кандинов И.Д.**, Кравцов Д В., Горшкова С.А., Винокурова А.С., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А. Полногеномный анализ *Neisseria gonorrhoeae*: генетическое разнообразие и устойчивость к антимикробным препаратам. Сборник тезисов 3-го Российского микробиологического конгресса. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г. Сборник тезисов. с. 122-123. ISBN 978-5-00200-015-9

8. **Кандинов И.Д.**, Шаскольский Б.Л., Кравцов Д В., Дерябин Д.Г., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А. Полногеномный анализ *Neisseria gonorrhoeae*: установление маркеров адаптивного преимущества и синтонической структуры. 9-я Всероссийская научно-практическая конференция по геномному секвенированию и редактированию. Москва, 19 мая 2021 г. ISBN 978-5-88458-543-0