

Санкт-Петербургский государственный университет

Шабалина Анна Вячеславовна

Мутации генов субъединиц гиразы и топоизомеразы IV у изолятов *Mycoplasma hominis*, выделенных на территории Санкт-Петербурга

Выпускная квалификационная работа бакалавра
по направлению подготовки Биология
основная образовательная программа бакалавриата 020400 Биология

Работа выполнена в лаборатории
молекулярно-биологических технологий отдела новых технологий
НИИ ЭМ им. Пастера
(зав. лаб. – науч. сотр. НИИ ЭМ им. Пастера, к.б.н., Фрейлихман О. А.)

Научные руководители:
мл. науч. сотр. НИИ ЭМ им. Пастера
Ваганова Анастасия Николаевна
ст. преп. каф. микробиологии СПбГУ
Коженкова Елена Васильевна

Санкт-Петербург

2018 г.

Содержание

Введение	5
1. Обзор литературы.....	8
1.1 Систематическое положение и биология <i>Mycoplasma hominis</i>	8
1.1.1 Геном <i>M. hominis</i>	8
1.1.2 Морфология <i>M. hominis</i>	9
1.1.3 Метаболизм <i>M. hominis</i>	9
1.1.3.1 Системы транспорта питательных веществ и минеральных солей.....	11
1.2 Особенности <i>M. hominis</i> , связанные с её патогенностью.....	12
1.2.1 Адгезия <i>M. hominis</i> к клеткам хозяина	13
1.2.2 Взаимодействие <i>M. hominis</i> с иммунной системой и антигенная изменчивость.....	14
1.2.3 Адаптация <i>M. hominis</i> к получению питательных веществ в организме хозяина	15
1.2.4 Развитие внутриклеточной инфекции <i>M. hominis</i>	16
1.2.5 Внутривидовые различия патогенных свойств <i>M. hominis</i>	17
1.3 Устойчивость <i>M. hominis</i> к противомикробным препаратам	19
1.4 Структура фторхинолонов и особенности развития резистентности к ним у патогенных для человека микоплазм	20
1.4.1 Мишени фторхинолонов	22
1.4.2 Факторы устойчивости бактерий к фторхинолонам	24
1.4.3 Особенности развития устойчивости к фторхинолонам у представителей вида <i>M. hominis</i>	27
2. Материалы и методы	29
2.1 Объект исследования	29
2.2 Культивирование <i>M. hominis</i>	29
2.3 Определение минимальных подавляющих концентраций.....	29
2.4 Выделение ДНК.....	31
2.5 Полимеразная цепная реакция	31
2.6 Выделение ДНК из геля.....	33
2.7 Секвенирование ДНК.....	33
2.8 Обработка данных секвенирования.....	33
2.9 U-критерий Уилкоксона – Манна – Уитни	34
3. Результаты.....	36
3.1 Культивирование изолятов <i>M. hominis</i> и определение минимальной подавляющей концентрации (МПК)	36
3.2 Оптимизация ПЦР и очистка ампликонов	38
3.3 Анализ результатов секвенирования.....	39

3.4 Оценка связи выявленных мутаций с устойчивостью к фторхинолонам.....	41
4. Обсуждение.....	42
Выводы	44
Список литературы.....	45
Приложение 1.....	52

Список использованных сокращений

АТФ – аденозинтрифосфат

г – грамм

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мин – минута

мкг – микрограмм

мкл – микролитр

мл – миллилитр

МПК – минимальная подавляющая концентрация

нм – нанометр

пкмоль – пикомоль

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

с – секунда

т.п.о. – тысяч пар оснований

ABC – ATP-binding cassette

EGFR – epidermal growth factor receptor

g – RCF – relative centrifugal force

QRDR – quinolone resistance determining region

PPLO – Pleuropneumonia-like organism (плевропневмониеподобные организмы)

Введение

Более десятка видов микоплазм могут обитать в организме человека. Среди них есть патогенные виды, *Mycoplasma pneumoniae* и *M. genitalium*, а также условно-патогенные микоплазмы: *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. spermatophilum* и *M. hominis*. В организме человека микоплазмы преимущественно колонизируют органы мочеполовой и дыхательной систем.

M. hominis является условно-патогенной бактерией и в здоровом организме обитает в урогенитальном тракте в качестве комменсала. Главным образом, она ассоциирована с развитием различных болезней мочеполовой системы, например, таких как бактериальный вагиноз, воспалительные заболевания органов малого таза, бесплодие. В редких случаях *M. hominis* может распространяться в организме, заселяя другие ткани и органы, в результате чего спектр вызываемых заболеваний расширяется до септицемии, артрита и других болезней. При этом *M. hominis* представляет собой серьёзную угрозу для беременных женщин и плода, поскольку она может вызвать ряд тяжёлых нарушений, включая задержку развития плода и мертворождение. У новорождённых детей она является причиной развития менингита, пневмонии, хронической болезни лёгких и различных абсцессов. Наиболее остро проявляются патогенные свойства *M. hominis* у людей с ослабленным иммунитетом.

Несмотря на то, что *M. hominis* участвует в развитии довольно широкого круга заболеваний, причины, по которым она превращается из комменсала в патогена, до сих пор до конца не изучены. *M. hominis* характеризуется генетической гетерогенностью, и геномы её изолятов могут довольно сильно различаться между собой. За счёт антигенной вариабельности *M. hominis* уклоняется от иммунитета хозяина и занимает новые ниши в организме. Всё это приводит к затруднению оценки её патогенного потенциала.

Высокая частота мутаций, характерная для *M. hominis*, вносит существенный вклад в развитие устойчивости к антибиотикам и противомикробным соединениям, которые применяются для лечения микоплазмозов. Выбор препаратов для борьбы с микоплазмами ограничен особенностями их цитологии и физиологии, например, на них не действуют соединения, относящиеся к бета-лактамам и сульфаниламидам. Для лечения заболеваний человека, вызванных микоплазмами, в основном применяют макролиды, фторхинолоны и тетрациклины, но в последнее время наблюдается значительное снижение их эффективности. Применение макролидов в качестве препаратов первой линии

определяется их низкой токсичностью, благодаря которой их можно назначать в детском возрасте и при беременности. В качестве препаратов второй линии обычно рассматривают фторхинолоны и тетрациклины.

Такие противомикробные соединения, как фторхинолоны не только оказывают неблагоприятное воздействие на организм пациента, но и длительно сохраняются в воде и почве после выведения из него. Присутствие фторхинолонов во внешней среде способствует накоплению мультирезистентных бактерий, и, кроме того, они могут обладать генотоксическим эффектом, поэтому их рассматривают в качестве загрязнителей окружающей среды (Khadra A. et al., 2012).

Одной из причин увеличения числа штаммов, резистентных ко многим противомикробным препаратам, считают появление мутаций в генах, кодирующих мишени данных соединений. В случае фторхинолонов мишенями являются топоизомеразы второго порядка: гираза и топоизомераза IV. В ходе изучения генов, которые кодируют данные ферменты, в них были выявлены области, мутации в которых приводят к развитию устойчивости к этим препаратам. Эти участки были названы областями, определяющими резистентность к фторхинолонам, или *quinolone resistance determining region (QRDR)*. В работах, посвящённых исследованию устойчивости *M. hominis* к фторхинолонам, координаты QRDR были определены для каждого гена. В гене *gyrA* эта область расположена на участке между 346 и 738 нуклеотидами, в гене *gyrB* - между 1270 и 1493 нуклеотидами (Bebear C.M. et al., 1997), в гене *parC* - между 139 и 573 нуклеотидами, в гене *parE* - между 1207 и 1503 нуклеотидами (Bebear C.M. et al., 1998).

Целью данного исследования является выявление изолятов *M. hominis*, выделенных на территории Санкт-Петербурга, являющихся носителями мутаций в генах субъединиц гиразы и топоизомеразы IV, и оценка их восприимчивости к фторхинолонам. В рамках поставленной цели решаются следующие задачи:

1. Выявление устойчивых к фторхинолонам штаммов *M. hominis*, выделенных в лаборатории иммунохимических технологий НИИ ЭМ им. Пастера.
2. Амплификация и секвенирование геномных последовательностей *M. hominis*, мутации в которых ассоциированы с устойчивостью к фторхинолонам.
3. Оценка вклада выявленных мутаций в развитие устойчивости у штаммов с различными показателями резистентности к фторхинолонам.

Работа выполнена в лаборатории молекулярно-биологических технологий отдела новых технологий, НИИ ЭМ им. Пастера.

1. Обзор литературы

1.1 Систематическое положение и биология *Mycoplasma hominis*

Микоплазмы — лишённые клеточной стенки бактерии размером от 300 нм до 800 нм. В настоящее время их относят к филе *Tenericutes*, классу *Mollicutes*, порядку *Mycoplasmatales*, семейству *Mycoplasmataceae*. Род *Mycoplasma* является полифилетическим, и на основании особенностей последовательности 16S рРНК его разделяют на кластеры *hominis* и *pneumoniae*. Также выделяют сборный “кластер *mycoides*”, включающий 5 видов (Krieg N.R. et al., 2010).

Микоплазмы являются комменсалами, условно-патогенными, как *Mycoplasma hominis*, и патогенными бактериями. У разных видов существуют разные способы взаимодействия с организмом хозяина. К примеру, у видов кластера *pneumoniae* есть специфическая прикрепительная органелла для клеточной адгезии. Другие виды обладают различными белками-адгезинами, которые, как правило, представлены у одного микроорганизма несколькими семействами. У *M. hominis* имеются мультигенные семейства антиген-вариабельных белков, некоторые из которых участвуют в прикреплении или в гемагглютинации (Kitzerow A. et al., 1999).

1.1.1 Геном *M. hominis*

Для всех микоплазм характерен малый размер генома, варьирующий в пределах 580–1350 т. п. о. (Krieg N.R. et al., 2010). *M. hominis* имеет кольцевую хромосому из 665 т. п. о., это один из самых маленьких геномов среди бактерий (Pereyre S. et al., 2009). Почти все гены, найденные у *M. hominis*, являются общими для многих видов микоплазм. Однако некоторые кодирующие последовательности ДНК *M. hominis* были получены путём горизонтального переноса от комменсальных и патогенных бактерий, не относящихся к микоплазмам, например, N-диметиларгинин диметиламиногидролаза, которая обеспечивает более эффективный метаболизм аргинина (Pereyre S. et al., 2009).

У *M. hominis* можно выделить основной набор генов, продукты которых осуществляют метаболизм. К числу таких генов относятся гены ферментов аргинин деиминазного пути, ген диметиларгинин диметиламиногидролазы, специфичные для *M. hominis* гены фосфопентомутазы и фосфокетолазы, а также гены глюкозо-6-фосфат изомеразы, лактат дегидрогеназы и глицерол-3-фосфат дегидрогеназы, которые, возможно, необходимы для оптимального получения энергии (Pereyre S. et al., 2009). Более того, было обнаружено множество генов, кодирующих ферменты, относящиеся к нескольким десяткам разных метаболических путей, но стоит отметить, что большинство

энергообразующих путей укорочено, следствием чего является их низкая продуктивность (Parvege M.M. et al., 2014; Pereyre S. et al., 2009).

Обнаружены также гены, специфичные для *M. hominis*, продуктами которых являются поверхностные белки и липопротеины. К ним относятся адгезин Vaa, липопротеин P120 и протеин P120', которые определяют антигенную изменчивость, мембранные белки P60 и P80, P75 и P75-связанный липопротеин, белки семейства Lmp, участвующие в уклонении от механизмов защиты хозяина (Pereyre S. et al., 2009). Также к числу специфичных генов относится ген OppA, который не был обнаружен у других представителей данного класса (Pereyre S. et al., 2009).

1.1.2 Морфология *M. hominis*

Отсутствие клеточной стенки придаёт *M. hominis* и другим микоплазмам особые свойства: они плеоморфны и, в зависимости от осмотического давления, фазы роста и качества питательных веществ, могут быть сферическими, колбовидными, скрученными палочками или тонкими разветвлёнными нитями. Также, благодаря этой особенности, они устойчивы к литической активности лизоцима (Krieg N.R. et al., 2010) и противомикробным препаратам, нарушающим процесс формирования клеточной стенки (Parvege M.M. et al., 2014). С другой стороны, микоплазмы чувствительны к осмотическому шоку и различным агентам, вызывающим лизис бактериальных протопластов (Krieg N.R. et al., 2010).

На питательной среде микоплазмы, включая *M. hominis*, образуют довольно характерные колонии в виде яичницы-глазуни. При этом у разных видов поверхность колонии может быть гладкой или бугристой, а края колонии варьируют от ровных до зубчатых в зависимости от концентрации агара и условий культивирования (Krieg N.R. et al., 2010).

1.1.3 Метаболизм *M. hominis*

Среди микоплазм есть аэробы, но большинство патогенных и условно-патогенных микоплазм, включая *M. hominis* — факультативные анаэробы. У всех представителей рода укороченная дыхательная цепь, отсутствуют хиноны и цитохромы, которые участвуют в окислительном фосфорилировании, также они лишены полного цикла трикарбоновых кислот (Krieg N.R. et al., 2010).

По типу питания микоплазмы относятся к хемоорганотрофам, при этом основным источником энергии для ферментирующих видов являются сахара, расщепление которых сопровождается закислением среды, а неферментирующие виды используют в качестве

источника энергии аргинин, который они гидролизуют до аммиака и CO₂, при этом защелачивая среду (Krieg N.R. et al., 2010). Кроме того, как и все микоплазмы, *M. hominis* нуждается в присутствии холестерина или близких по структуре стиролов (Krieg N.R. et al., 2010).

Использование аргинина в качестве основного субстрата является уникальной особенностью *M. hominis*, и его отсутствие не компенсируется с помощью других аминокислот и потенциальных источников энергии (Harasawa R. et al., 1992; Schimke R.T. et al., 1966). Аргинин поступает в клетку в свободной форме и в составе олигопептидов, однако механизм транспорта этих соединений в настоящее время не описан (Pereyre S. et al., 2009). Для катаболизма аргинина используется аргинин деиминазный путь, который включает в себя всего 3 фермента, что является преимуществом для *M. hominis*, геном которой довольно ограничен по размеру (Pereyre S. et al., 2009; Schimke R.T. et al., 1966).

К ферментам аргинин деиминазного пути относятся аргинин деиминаза, орнитин карбамоилтрансфераза и карбоматкиназа, которые совместно составляют одну десятую часть всех растворимых белков, синтезируемых *M. hominis* (Barile M.F. et al., 1966). Ферменты данного пути не подвержены катаболической репрессии, их активность не изменяется при росте на среде с различными потенциальными источниками энергии (Schimke R.T. et al., 1966). К отличительным признакам аргинин деиминазы *M. hominis* относятся способность проявлять себя в роли иммуносупрессора в клетках хозяина, влиять на ингибирование бластогенеза лимфоцитов, а также участвовать в индуцировании роста опухолей (Harasawa R. et al., 1992).

Вдобавок к вышеперечисленным трём ферментам, у *M. hominis* существует ещё один фермент – диметиларгинин диметиламиногидролаза, участвующий в образовании цитруллина из диметиларгинина. (Pereyre S. et al., 2009). Также существует гипотеза, говорящая о том, что с помощью данного фермента *M. hominis* способна стимулировать синтез оксида азота макрофагами хозяина с последующим повреждением тканей (Pereyre S. et al., 2009).

Катаболизм аргинина служит не только основным источником энергии, но и имеет значение для защиты *M. hominis* от неблагоприятных условий среды обитания: формирование аммиака снижает отрицательное влияние кислой среды на бактерий, что дополнительно может способствовать их патогенности (Pereyre S. et al., 2009).

Несмотря на то, что *M. hominis* относится к негликолитическим бактериям, в её геноме содержатся гены, кодирующие почти все ферменты гликолиза, за исключением гена 6-фосфофруктокиназы, поэтому катаболизм глюкозы у этих бактерий имеет ряд особенностей. Функции данного гена могут компенсировать глицерол-3-фосфатдегидрогеназа и триозофосфатизомераза (Pereyre S. et al., 2009). Кроме того, у *M. hominis* имеется фосфокетолаза, которая участвует в превращении ксилулозы-5-фосфат в глицеральдегид-3-фосфат с образованием ацетилфосфата (Pereyre S. et al., 2009).

Пентозофосфатный путь у *M. hominis* также является неполным из-за отсутствия генов, продуктами которых являются ферменты окислительного этапа: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (Pereyre S. et al., 2009).

M. hominis продуцирует ферменты цикла трикарбоновых кислот, но их активность довольно низкая (Schimke R.T. et al., 1966). В то же время гены, продуктами которых являются ферменты пируватдегидрогеназного комплекса, необходимые для окислительного декарбоксилирования пирувата, и ген фосфотрансацетилазы, участвующей в синтезе ацетил-КоА, обнаружены не были. Однако у микроорганизма сохранён фермент ацетаткиназа, которая, возможно, участвует в синтезе АТФ (Pereyre S. et al., 2009).

1.1.3.1 Системы транспорта питательных веществ и минеральных солей

Из-за ограниченного набора генов *M. hominis* не способна сама синтезировать большинство жизненно важных компонентов. Это компенсируется специальными системами, обеспечивающими эффективное поглощение всех необходимых субстратов. Одной из таких систем является система транспорта олигопептидов Opp, которая состоит из четырёх коровых доменов OppBCDF и субстрат связывающего домена OppA. Перенос олигопептидов осуществляется через поровый канал, образованный двенадцатью трансмембранными сегментами доменов OppB и OppC. OppD и OppF представляют собой АТФ-связывающие домены, имеющие наибольшую гомологию с доменами транспортных систем других видов микоплазм. Домен OppA представлен липопротеином P100, который отвечает за клеточную адгезию и не имеет строгой субстратной специфичности (Henrich B. et al., 1999). Более того, существует предположение, что этот липопротеин является и главной экто-АТФазой на поверхности *M. hominis*. В одном из исследований было показано, что эта АТФаза индуцирует выход АТФ из клеток хозяина, следствием чего является их апоптоз. Это даёт основание предполагать, что данный мультифункциональный липопротеин также может играть роль одного из факторов вирулентности (Pereyre S. et al., 2009).

Также у *M. hominis* обнаружены отдельные элементы фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы, участвующей в транспорте углеводов у бактерий. Найдены белок HPr, который, вероятно, участвует в фосфорилировании сахаров, и модуль В фермента II, являющийся субстрат-специфичной пермеазой. Другие компоненты этой системы у *M. hominis* не выявлены (Pereyre S. et al., 2009). Также в геноме *M. hominis* не было обнаружено генов, кодирующих транспортёры аммиака и аммония (Pereyre S. et al., 2009).

Таким образом, несмотря на наличие большого числа генов, продуктами которых являются ферменты разнообразных путей метаболизма углеводов, потенциальная возможность их использования в качестве источников энергии не реализуется из-за отсутствия ключевых ферментов, подходящих переносчиков или, в целом, невозможности скоординировать все эти пути для полноценного производства энергии. В результате этого основным способом получения энергии является гидролиз аргинина, а большинство других необходимых компонентов поступают через специальные транспортные системы.

1.2 Особенности *M. hominis*, связанные с её патогенностью

В геноме *M. hominis* были найдены гены, продуктами которых являются белки, ассоциированные с патогенностью. В развитии патологических процессов принимают участие адгезины и вспомогательные белки, нуклеазы, провоспалительные и проапоптотические мембранные липопротеины. Рост *M. hominis* сопровождается выделением аммиака, который обладает выраженным цитотоксическим эффектом. Для уклонения от иммунитета хозяина *M. hominis* используют системы вариабельных поверхностных антигенов. Также у этих микоплазм была отмечена способность подавлять иммунные клетки хозяина, их рецепторы и цитокины (Krieg N.R. et al., 2010).

За счёт имеющихся факторов патогенности *M. hominis* вызывает различные воспалительные заболевания мочеполовой системы: вагинит, пиелонефрит, воспалительные заболевания малого таза, хориоамнионит, послеродовую лихорадку у женщин, а также является одной из возможных причин мужского бесплодия и негонококкового уретрита (Krieg N.R. et al., 2010; Solomon M., Henkel R., 2017). *M. hominis* часто выявляется при бактериальном вагинозе, хотя её точная роль и значение в развитии этой болезни до конца не известны (Waites K.B. et al., 2009). Кроме того, *M. hominis* может преодолевать гематоплацентарный барьер и быть причиной врождённой пневмонии, менингита, вызывать абсцессы у новорождённых. Более того, эти микоплазмы

выявляются при инфекциях, обусловленных введением катетеров и установлением протезов (Krieg N.R. et al., 2010).

1.2.1 Адгезия *M. hominis* к клеткам хозяина

Одним из важных этапов в развитии инфекции для *M. hominis* является прикрепление к хозяйской клетке. В адгезии участвуют поверхностные липопротеины и белки *M. hominis*, а также рецепторы хозяина, которые расположены на поверхности клеток.

В экспериментах с ингибированием сульфат-зависимого связывания было показано, что рецепторами *M. hominis* являются сульфатированные гликолипиды (Kitzerow A. et al., 1999). Более того, адгезия *M. hominis* к сульфатированным структурам и молекулам внеклеточного матрикса ведёт к увеличению количества белков в клетке хозяина, участвующих в интернализации патогена (Hopfe M. et al., 2013, Diaz-Garcia F.J. et al., 2006).

Одним из наиболее часто встречающихся белков-адгезинов *M. hominis* является белок Vaa. С-терминальная область Vaa может варьировать по составу и размеру, формируя тем самым антигенные различия (Zhang Q., Wise K.S., 1997, Zhang Q., Wise K.S., 2001).

У *M. hominis* Vaa белок кодируется альтернативными аллельными формами гена *vaa*, в результате чего наблюдается антигенное разнообразие данного адгезина среди разных штаммов (Zhang Q., Wise K.S., 1997; Zhang Q., Wise K.S., 2001, Boesen T. et al., 1998). Было выделено 5 типов гена *vaa*, которые содержат несколько одинаковых модулей, а остальные являются взаимозаменяемыми и представляют собой прямые повторы (Boesen T. et al., 1998). Уровень экспрессии гена *vaa* определяется обратимыми мутациями со сдвигом рамки считывания в определённом полиадениновом участке на 5'-конце гена *vaa* (Zhang Q., Wise K.S., 1997). Данная мутация оказывает непосредственное влияние на трансляцию первичного продукта, что в дальнейшем отражается на адгезии к клеткам хозяина (Zhang Q., Wise K.S., 1997; Zhang Q., Wise K.S., 2001).

Известны варианты *M. hominis*, лишённые Vaa белка, но не утратившие способность прикрепляться к клеткам хозяина, что указывает на существования дополнительных механизмов адгезии (Zhang Q., Wise K.S., 1997). Одним из дополнительных адгезинов служит белок P50, также взаимодействующий с сульфатированными рецепторами за счёт равномерно распределённых в молекуле

заряженных аминокислотных остатков (Kitzerow A. et al., 1999). Также белок P50 содержит мотив “лейциновая молния”, однако у некоторых штаммов он утрачен (Kitzerow A. et al., 1999).

Другими распространёнными белками на поверхности *M. hominis* являются семейство белков Lmp и дополнительные Lmp-связанные белки, характеризующиеся наличием нескольких повторяющихся последовательностей. Белки Lmp отличаются вариативностью размера (Pereyre S. et al., 2009), при этом у изолятов, выделенных из амниотической жидкости и плаценты, гены Lmp1 и Lmp-подобных белков короче, чем те же гены, присутствующие у штаммов из нижнего урогенитального тракта (Allen-Daniels M.J. et al., 2015). Возможно, высокое число белков в данном семействе и повторы в последовательностях служат основой для антигенной изменчивости (Pereyre S. et al., 2009).

У разных штаммов *M. hominis* наблюдаются различия в поверхностных липопротеинах, что отражается на том, в каком состоянии находятся бактерии: коагулированном или диспергированном. При этом первое состояние характерно для штаммов из влагалища, а второе — для амниотических и плацентарных штаммов (Allen-Daniels M.J. et al., 2015). Белки семейства Lmp также задействованы в коагуляции *M. hominis* (Zhang Q., Wise K.S., 2001).

При моделировании инфекции на дендритных клетках человека было показано, что на мембране возбудителя повышается количество предполагаемого адгезина, сходного по структуре с адгезином, описанным у *M. arthritidis* (Goret J. et al., 2016). При этом уровень экспрессии таких генов, как *vaa*, *oppA*, *lmp* не изменялся (Goret J. et al., 2016).

1.2.2 Взаимодействие *M. hominis* с иммунной системой и антигенная изменчивость

Возможность изменять эпитопы антигенов имеет большое значение для колонизации различных ниш в организме хозяина и выживания в них, а также необходима при уклонении от иммунной системы. Одним из наиболее известных антигенов *M. hominis* является адгезин Vaa, антигенная вариативность которого обычно связана с наличием мутаций (Zhang Q., Wise K.S., 1997). Так, взаимозаменяемые модули, которые присутствуют в генах белка Vaa, обладают разными иммуногенными свойствами, и при угнетении со стороны иммунной системы хозяина происходят нонсенс-мутации, в результате которых продукт гена утрачивает иммуногенные области, но при этом остаётся функционально активным (Boesen T. et al., 1998). Подобным свойством обладают и белки

Lmp, у которых в результате мутаций происходит удаление иммуногенных участков (Boesen T. et al., 1998).

Кроме того, была продемонстрирована способность некоторых белков к маскировке эпитопов. К таким белками относятся поверхностные липопротеины P120 и P56. Один из основных поверхностных липопротеинов P120 обладает гипервариабельной N-концевой областью, которая служит мишенью для гуморального ответа. Белок P56 также представлен на поверхности мембраны в большом количестве, однако встречается не у всех штаммов *M. hominis*. Он демонстрирует фазовую изменчивость, которая связана с тем, что липопротеин P120 избирательно его маскирует. При этом P120 не оказывает такого же действия на другие известные мембранные белки, такие как инвариантный G5 белок и Vaa адгезин. Более того, при проведении опытов обнаружили, что маскировка эпитопов белка P56 неполная и предложили два возможных объяснения. Во-первых, может быть замаскирована только часть эпитопов P56, а специфические эпитопы остаются доступными для определённых популяций антител. Во-вторых, возможно, липопротеин P120 скрывает полностью часть белков P56 (Zhang Q., Wise K.S., 2001).

На культуре клеток HeLa было установлено, что адгезия *M. hominis* сопряжена с индукцией про- и анти-апоптотических цитокинов и подавлением Hsp70. Ингибирование Hsp70 рассматривают как механизм уклонения от иммунитета, что может привести в результате к развитию хронической инфекции (Horfe M. et al., 2013).

1.2.3 Адаптация *M. hominis* к получению питательных веществ в организме хозяина

Среди генов, экспрессия которых повышается при модельной инфекции, выделены гены, продуктами которых являются предполагаемая рибонуклеаза и две предполагаемые пептидазы. Повышенная активность этих генов объясняется тем, что *M. hominis* нуждается в нуклеотидных и аминокислотных субстратах, которые сама синтезировать не способна, и получает их, разрушая компоненты клеток. Способность предполагаемой нуклеазы к гидролизу РНК до олигонуклеотидов приводит к проявлению цитопатических эффектов. В то же время этот фермент может участвовать в процессе связывания с клеткой хозяина и интернализации в неё. Одна из выявленных пептидаз является довольно консервативной и встречается у других видов микоплазм, а у второй, уникальной для *M. hominis*, обнаружен пептидазный домен DUF3, который относится к суперсемейству трипсиновых эндопептидаз. Считают, что эти две предполагаемые пептидазы могут также участвовать в уклонении от иммунной системы хозяина (Goret J. et al., 2016).

При прикреплении к клеткам у *M. hominis* происходит изменение экспрессии транспортёров субстрата. К примеру, найдены два гена паралога, продуктами которых являются субстрат-связывающие единицы АВС-транспортёра, гомологичные белку Р37 *M. hyorhinae*. У *M. hyorhinae* этот белок является тиаминсвязывающим липопротеином, который действует на металлпротеинкиназу-2 матрикса клетки хозяина и запускает процесс фосфорилирования EGFR, тем самым определяя инвазивность. По всей видимости, эти субстрат-связывающие единицы могут выполнять дополнительные функции, связанные с процессами проникновения микоплазм в клетки хозяина (Goret J. et al., 2016).

1.2.4 Развитие внутриклеточной инфекции *M. hominis*

M. hominis может присутствовать как на поверхности клеток, так и проникать в их цитоплазму. При этом проникновение *M. hominis* в клетку может привести к её злокачественному перерождению, что отмечалось, например, при развитии рака простаты. (Khan S. et al., 2016).

При этом до сих пор точно не описан процесс проникновения. Вероятно, в нём задействованы перестройки актинового цитоскелета, что было отмечено в опытах на культуре клеток HeLa (Hopfe M. et al., 2013). В исследованиях, проводимых на сперматозоидах, было показано, что *M. hominis* проникает в клетки с участием мембраносвязанной фосфолипазы, которая осуществляет запуск каскада передачи сигнала и стимулирует перестройки цитоскелета, в результате чего происходит поглощение бактерии (Diaz-Garcia F.J. et al., 2006). Вероятно, внутриклеточное расположение *M. hominis* имеет значение для уклонения от иммунитета хозяина и для персистенции (Diaz-Garcia F.J. et al., 2006). При этом у микоплазмы должны быть выработаны различные стратегии выживания внутри клетки хозяина.

При инфицировании *M. hominis* также наблюдается активация факторов и рецепторов, обеспечивающих фагоцитоз. Так, для хронически инфицированной линии клеток HeLa была установлена повышенная активация белков, связанных с воспалением, антимикробным воздействием и апоптозом. Также повышается активность рецепторов брадикинина В1 и В2, которые являются важными элементами механизма защиты хозяина от бактерий. При этом *M. hominis* находится в лизосомах. Персистенция микоплазм сопровождается подавлением сериновой протеазы катепсина-L и V-АТФазы, осуществляющей закисление лизосом (Hopfe M. et al., 2013).

Симбиотические отношения с *Trichomonas vaginalis* также помогают *M. hominis* уцелеть в организме хозяина и дополнительно увеличивают шансы более удачной передачи от одного человека другому (Hopfe M. et al., 2013; Parvege M.M. et al., 2014). Проникновение *M. hominis* в клетки *T. vaginalis* позволяет патогену уйти от защитных механизмов иммунитета хозяина и обеспечивает устойчивость к различным антибиотикам аминогликозидного ряда и фторхинолонам (Vancini R.G., Benchimol M., 2008). Было показано, что *M. hominis* проникает внутрь трихомонады при эндоцитозе с помощью окаймлённых ямок. В зависимости от штамма *T. vaginalis* микоплазма, оказавшаяся внутри неё, может быть переварена, выжить в вакуоле или выйти из этой вакуоли в цитоплазму. Образование везикул плазматической мембраны трихомонады при выходе *M. hominis* похоже на то формирование везикул, которое происходит в клеточной культуре HeLa, поэтому механизмы выхода могут быть схожи (Hopfe M. et al., 2013).

При развитии внутриклеточной инфекции отмечались изменения экспрессии генов, кодирующих белки, ассоциированные с онкогенезом, в том числе подавление экспрессии гена p53 и активация гена NF-kB (Khan S. et al., 2016). Было показано, что различные белки *M. hominis* способны связываться с ДНК человека, вытесняя белки хозяина, а ДНК топоизомераза I *M. hominis*, находясь в ядре клетки, может ослаблять или полностью ингибировать активность белков репарации ДНК. Все эти процессы могут привести к нарушениям регуляции клеточного цикла, росту числа мутаций и снижению эффективности репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (Khan S. et al., 2016), что повышает риск возникновения злокачественных клеток. Даже сам процесс инфицирования *M. hominis* может стимулировать канцерогенез посредством воздействия на онкоген H-ras и транскрипционный фактор *c-myc*, который участвует в клеточном цикле, апоптозе и трансформации клеток.

Возможно, *M. hominis* может оказывать влияние и на регуляцию экспрессии генов хозяина посредством воздействия сигма-субъединицы РНК-полимеразы *M. hominis* на РНК-полимеразу хозяина. Есть вероятность того, что *M. hominis* может быть одной из причин возникновения рака из-за горизонтального переноса генов между гомологичными последовательностями микоплазмы и хозяина, который может происходить при внутриклеточной колонизации (Khan S. et al., 2016).

1.2.5 Внутривидовые различия патогенных свойств *M. hominis*

M. hominis представляет собой гетерогенный вид, разные изоляты которого могут различаться генетически, иметь разные возможности для присоединения к клетке хозяина

и проникновения в неё, используя для этого различные липопротеины и белки (Goret J. et al., 2016; Allen-Daniels M.J. et al., 2015). Так, микоплазмы, у которых Vaa неактивен, могут использовать другой адгезин, который ранее не был описан. В качестве антиген-вариабельного белка может выступать не P56, который есть далеко не у всех штаммов, а белок с неизвестной функцией.

С учётом того, что у *M. hominis* довольно много белков с неизвестными функциями, то высока вероятность того, что часть вариантов вида *M. hominis* не имеют тех или иных белков. К примеру, при сравнении изолятов из амниотической жидкости и плаценты со штаммом, колонизирующим влагалище, было обнаружено, что в геномах этих изолятов есть 3 довольно характерных гена, которые отсутствуют у штамма из влагалища. Один ген кодирует аланин рацемазу, участвующую в превращении L-аланина в D-аланин, который является компонентом пептидогликана. Но у микоплазм нет пептидогликана, поэтому функция данного фермента у *M. hominis* неизвестна. Второй ген кодирует белок, структурно похожий на с39-подобную протеазу, и считают, что он может относиться к секретрируемым протеазам. Продуктом третьего гена является белок, который играет важную роль при росте на плаценте или в амниотической жидкости, но не участвует в проникновении в амниотическую полость. Его функция связана с адаптацией и выживанием в нишах, где наблюдается достаточно высокая конкуренция с компонентами нормальной микробиоты (Allen-Daniels M.J. et al., 2015). При этом амниотические и плацентарные изоляты различаются по структуре таких поверхностных белков, как Vaa, Vmp, P120, P75. Хотя Lmp и Lmp-подобные белки у них довольно схожи и, возможно, это связано с особенностями среды обитания данных изолятов (Allen-Daniels M.J. et al., 2015).

Следовательно, *M. hominis* является оппортунистическим патогеном, который способен существовать как вне клетки, так и внутри неё. При этом в рамках вида существуют разные варианты, которые демонстрируют наличие различных механизмов взаимодействия с хозяином с участием разнообразных белков и липопротеинов. Тем не менее ещё полностью не изучен весь потенциал генов *M. hominis*, ассоциированных с патогенностью, и механизмы взаимоотношения с хозяином должны быть исследованы более детально для дальнейшей разработки методов предотвращения развития болезней, связанных с *M. hominis*.

1.3 Устойчивость *M. hominis* к противомикробным препаратам

Развитие у бактерий устойчивости к противомикробным препаратам является важной проблемой в сфере здравоохранения, так как оно ведёт к утрате эффективности существующих схем терапии и необходимости разработки новых лекарств. Развитие лекарственной устойчивости может произойти по ряду причин: происходит ферментативная инактивация или модификация препарата, изменяется мишень, на которую направлен антибиотик, или вырабатывается защита этой мишени, также может происходить активное удаление препарата из клетки бактерии. Множественная устойчивость может быть обусловлена наличием характерных генов в хромосоме или плазмиде, и в тех случаях, когда устойчивость обусловлена плазмидными факторами, значительно повышается вероятность распространения этих генов среди других бактерий (Li X.Z., Nikaido H., 2009).

В отличие от большинства бактерий, микоплазмы, благодаря отсутствию клеточной стенки, обладают природной устойчивостью к антибиотикам, воздействующим на процесс её синтеза, в первую очередь к антибиотикам группы бета-лактамов. Неспособность синтезировать собственные нуклеотиды делает их устойчивыми к сульфаниламидам и триметоприму. Их РНК полимеразы не подвергается действию рифампицина. Отдельные виды благодаря мутациям в 23S рРНК устойчивы к макролидам (Krieg N.R. et al., 2010). Поэтому основные препараты для лечения микоплазмозов направлены на ингибирование синтеза белков и репликации ДНК. При этом отмечено, что микоплазмы приобрели широкий спектр устойчивости и к этим противомикробным препаратам.

Основными препаратами лечения инфекций, вызванных *M. hominis*, являются макролиды. Хотя эритромицин не является эффективным против этих патогенов (Waites K.B. et al., 2009), большинство изолятов отличаются высокой чувствительностью к более современным препаратам ряда макролидов, таким как азитромицин и джозимицин (Kenny G.E. et al., 1989). При инфекциях, вызванных устойчивыми к макролидам вариантами *M. hominis*, применяют фторхинолоны, в первую очередь левофлоксацин и моксифлоксацин, которые довольно эффективны при их лечении. Однако отмечены и случаи резистентности к этим препаратам (Waites K.B. et al., 2009). Тетрациклин оказывает бактериостатическое действие на *M. hominis*, но в настоящее время большинство штаммов резистентны к нему, что связано с наличием гена *tetM* (Waites K.B. et al., 2009; Bebear

С.М. et al., 1997). Также отмечена восприимчивость *M. hominis* к клиндамицину (Waites К.В. et al., 2009).

Аминогликозиды, плевомутилины и фениколы широко не используются для лечения микоплазмоза человека, за исключением хлорамфеникола, который назначают новорождённым с микоплазмозом ЦНС, не реагирующим на другие препараты (Krieg N.R. et al., 2010).

Применение в практике противомикробных препаратов различных групп привело к распространению устойчивых к ним вариантов *M. hominis*, при этом выделяются и изоляты с множественной лекарственной устойчивостью. Например, было отмечено, что изоляты *M. hominis*, которые обладают устойчивостью к ципрофлоксацину, менее подвержены действию макролидов, офлоксацина и тетрациклина (Kenny G.E. et al., 1989).

В отличие от других патогенных микоплазм, *M. hominis* устойчива ко многим препаратам не только благодаря особенностям морфологии и физиологии, но и за счёт симбиотических отношений с *T. vaginalis* (Parvege M.M. et al., 2014).

1.4 Структура фторхинолонов и особенности развития резистентности к ним у патогенных для человека микоплазм

Хинолоны — синтетические противомикробные соединения, которые являются производными 4-оксо-3-хинолкарбоновой кислоты. Первые хинолоны, к числу которых относится налидиксовая кислота (рисунок 1), использовали в терапевтических целях в 1962 году, и в их состав не входил фтор, а спектр их действия был довольно ограничен.

Впоследствии путём различных модификаций кодра хинолона, были получены новые соединения ряда хинолонов, обладавшие более широким спектром действия, более высокой клинической эффективностью и более оптимальной фармакокинетикой. Более

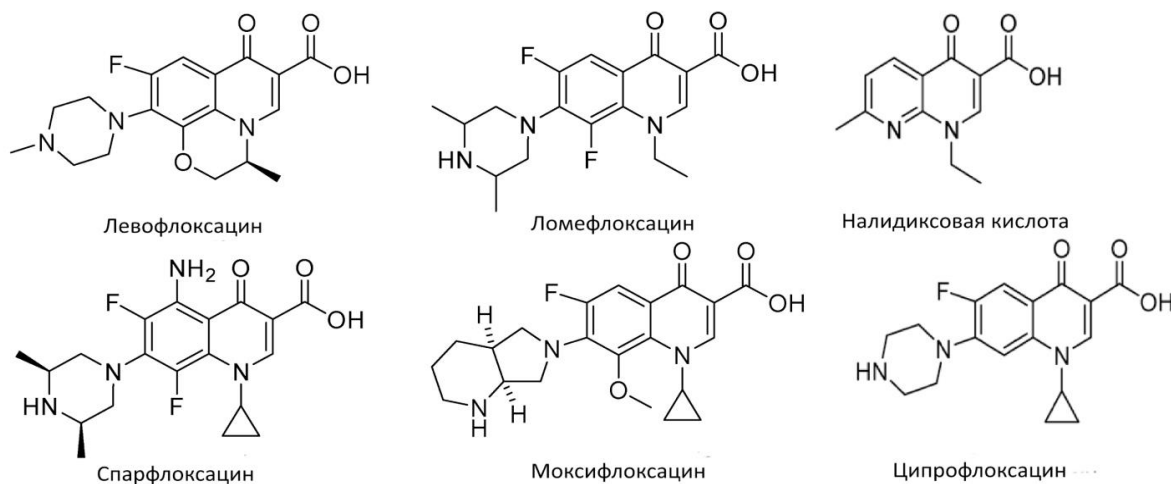


Рисунок 1. Структуры налидиксовой кислоты и некоторых соединений из ряда фторхинолонов.

того, вероятность развития резистентности к этим соединениям была ниже, чем к первым хинолонам.

Во второй половине 80-х годов в практику вошли препараты ряда фторхинолонов, полученные путём введения атома фтора в шестую позицию кора хинолона (рисунок 1). По эффективности эти соединения и сегодня превосходят многие другие антибактериальные препараты и являются второй по частоте использования группой противомикробных препаратов после бета-лактамов. Первыми представителями фторхинолонов стали норфлоксацин и ципрофлоксацин. В дальнейшем, путём присоединения карбо- и гетероциклов к бициклической системе кора фторхинолонов, были получены препараты с более выраженной антибактериальной активностью, у которых также отмечалась противовирусная и противоопухолевая активности (В.Н. Чарушин и др., 2013; Hooper D.C., Jacoby G.A., 2015).

В результате появления большого количества фторхинолонов, отличающихся по своим свойствам, предпринимались попытки создать общепризнанную классификацию данных противомикробных соединений, но до настоящего времени этого сделать не удалось, а все подразделения их на группы условны. В качестве примера можно привести следующее подразделение:

- Первое поколение: пефлоксацин и офлоксацин. Пефлоксацин применяют при борьбе с некоторыми внутриклеточными патогенами, а офлоксацин - с представителями семейства *Enterobacteriaceae*. Офлоксацин находится в виде рацемической смеси R- и L-энантиомеров, из которых активностью обладает L-энантиомер (Fernandes P.V., 1988);
- Второе поколение: ципрофлоксацин, норфлоксацин, ломефлоксацин. Ципрофлоксацин активен против аэробов и бактерий рода *Rickettsia*, а ломефлоксацин эффективен против анаэробных микроорганизмов (Fernandes P.V., 1988). С их помощью лечат урологические заболевания, инфекции желудочно-кишечного тракта и инфекции, передающиеся половым путём (В.Н. Чарушин и др., 2013);
- Третье поколение: левофлоксацин, спарфлоксацин. Левофлоксацин способен проникать в макрофаги, медленнее выводится из организма по сравнению со спарфлоксацином и может содержаться в крови при более высоких концентрациях

(Mayer C., Takiff H., 2014). Их чаще всего применяют при лечении заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, кожных инфекций (В.Н. Чарушин и др., 2013);

- Четвёртое поколение: моксифлоксацин, гемифлоксацин. Они обладают более выраженной двойной активностью с одинаковым действием на гиразу и топоизомеразу IV. Более того, к этим препаратам реже происходит развитие устойчивости (Blondeau J.M., 2004; Sahm D.F. et al., 2003).

Фторхинолоны применяют для лечения микоплазмозов у людей с подавленным иммунитетом, так как по сравнению с другими группами антимикробных препаратов, такими как аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, они оказывают не только бактериостатическое действие, но ещё и бактерицидное (В.Н. Чарушин и др., 2013; А.Н. Ваганова, 2017).

Мишенями фторхинолонов являются ДНК-топоизомеразы бактерий, в первую очередь топоизомеразы второго типа: ДНК-гираза и ДНК-топоизомераза IV, при этом они не связываются с ДНК-топоизомеразами клеток человека и животных (В.Н. Чарушин и др., 2013). Соединения ряда фторхинолонов обладают разным сродством к лигазным доменам субъединиц гиразы и топоизомеразы IV, что связано с разной чувствительностью этих ферментов у различных бактерий. Например, считается, что первичной мишенью фторхинолонов у грамотрицательных бактерий чаще всего является гираза, а у грамположительных - топоизомераза IV (Hooper D.C., 2001). При этом ещё не решён до конца вопрос о первичности и вторичности мишеней фторхинолонов, поэтому для каждого вида и каждого препарата мишени оцениваются индивидуально (Aldred K.J. et al., 2014)

Из-за наиболее оптимальной фармакокинетики фторхинолоны применяют при тяжёлых заболеваниях, но при этом они обладают рядом побочных эффектов: фототоксичность из-за нарушения структуры молекулы фторхинолона под действием ультрафиолета с последующей индукцией свободных радикалов; судороги в результате ингибирования рецепторов ГАМК; подавление метаболизма ксантинов и метилксантинов; нарушение нормального развития хрящевой ткани и другие (В.Н. Чарушин и др., 2013).

1.4.1 Мишени фторхинолонов

Топоизомеразы второго типа являются жизненно необходимыми ферментами, которые играют роль в ряде важных процессов, протекающих в клетке, в том числе и в репликации ДНК. Эти ферменты катализируют двухцепочечные разрывы цепи ДНК, переносят другую цепь ДНК через разрыв, а затем сшивают его. Они представляют собой

гетеротетрамеры: гираза состоит из субъединиц GyrA и GyrB, а топоизомераза IV — из субъединиц ParC и ParE, при этом субъединица GyrA гомологична субъединице ParC, а GyrB — ParE. В субъединицах GyrA и ParC локализованы домены для связывания с ДНК, её разрыва и лигирования, а в ParE и GyrB - АТФазные домены и домены связывания с ДНК (Hooper D.C., Jacoby G.A., 2015; А.В. Пиневич, 2009; Bisacchi G.S., Hale M.R., 2016). При этом гираза и топоизомераза IV задействованы в различных процессах регуляции работы генома, могут обеспечивать внутримолекулярные и межмолекулярные переносы цепи ДНК и только частично могут компенсировать утрату функции друг друга (Pommier Y. et al., 2010).

Гираза в первую очередь участвует в отрицательном суперскручивании ДНК во время репликации, то есть она осуществляет внутримолекулярный перенос. Топоизомераза IV является высокоспецифичным ферментом, который проводит межмолекулярные реакции, а именно декатенацию, или разделение дочерних хромосом при делении клетки (Pommier Y. et al., 2010). Поддержание суперскручивания необходимо в ключевых генетических процессах, которые контролируют экспрессию генов и определяют фенотип клетки. Сильное изменение степени суперскручивания влияет на экспрессию множества генов, в том числе и тех, которые участвуют в стрессовом ответе и патогенезе (Redgrave L.S. et al., 2014).

Для осуществления ферментативной активности гираза или топоизомераза связывается при помощи ковалентных связей с ДНК, образуя ДНК-ферментативный комплекс. При появлении фторхинолонов они связываются с поверхностью субъединиц ферментов, которые в данный момент находятся в комплексе с ДНК, тем самым образуя тройной комплекс (Bisacchi G.S., Hale M.R., 2016). Фторхинолоны ингибируют работу фермента, тем самым блокируя лигирование разрыва и сохраняя комплекс ДНК-фермент. Подобные комплексы с разрезанными сегментами ДНК называют расщепляющими (Redgrave L.S. et al., 2014). Образование таких комплексов мешает прохождению вилки репликации, и, более того, может привести к образованию других двухцепочечных разрывов. (Hooper D.C., Jacoby G.A., 2015). В результате появления в ДНК множественных двухцепочечных разрывов запускаются различные сигнальные каскады, которые приводят к гибели клетки (Bisacchi G.S., Hale M.R., 2016).

Взаимодействие фторхинолонов с ферментами-мишенями, гиразой и топоизомеразой IV, происходит схожим образом. Оно протекает в несколько этапов и включает взаимодействие с аминокислотами, окружающими каталитически-активную

область фермента, и последующее связывание с консервативным остатком аргинина в этой области.

Чаще всего устойчивость к фторхинолону возникает в результате изменений остатка серина и находящегося вниз по течению остатка аспартата или глутамата, которые участвуют в заякоривании фторхинолона. Было показано, что хинолоны связывают некаталитический ион магния, который и участвует в формировании мостика. Считается, что связь, которую обеспечивает магний-водный мостик, является первым этапом взаимодействия между хинолоном и топоизомеразами второго типа (Naeem A. et al., 2016). Этот ион координирован четырьмя молекулами воды, две из которых расположены довольно близко к серину и глутамату или аспартату, которые расположены на входе в белковый “карман”, скрывающий активный центр, а другие две молекулы воды связаны с аминогруппой препарата. Таким образом, формируются водородные связи, с помощью которых происходит соединение препарата с ферментом (Aldred K.J. et al., 2014; Wohlkonig A. et al., 2010; Collin F. et al., 2011; Mustaev A. et al., 2014). Вероятно, замена этих аминокислот ведёт к снижению способности хинолонов связываться с ферментами посредством водородной связи и ограничивает разнообразие ионов металлов, поддерживающих активность данных препаратов (Naeem A. et al., 2016). В активном центре происходит связывание фторхинолона с аргинином, в результате чего нарушается работа фермента. Замена аргинина невозможна, поскольку она может привести к гибели бактерии (Lupala C.S. et al., 2013). Возможно, снижение эффективности взаимодействия фторхинолона с ферментами связано с изменением их конформации в результате замен других аминокислот (Mayer C., Takiff H., 2014).

Таким образом, данные топоизомеразы служат хорошими мишенями для разных противомикробных препаратов по ряду следующих причин: они необходимы для клеточного деления и репликации; накопление комплексов, способных расщеплять ДНК, имеет не только бактериостатический эффект, но ещё и бактерицидный; препараты демонстрируют высокий уровень специфичности к данным мишеням, поэтому они не опасны для топоизомераз человека; так как гиразы и топоизомераза IV гомологичны, то многие препараты нацелены на оба фермента (Pommier Y. et al., 2010).

1.4.2 Факторы устойчивости бактерий к фторхинолонам

Фторхинолоны являются действенными препаратами как по отношению к грамотрицательным, так и грамположительным бактериям, но при этом развитие устойчивости к ним также является естественным событием в разных группах

микроорганизмов. Более того, в зависимости от различных характерных особенностей бактерии выработали разные способы приобретения устойчивости (Redgrave L.S. et al., 2014).

Одним из таких способов являются мутации в бактериальных топоизомеразах второго типа. Мутации, отвечающие за приобретение устойчивости, чаще всего появляются в определённом участке ДНК, который называется область, определяющая устойчивость к хинолонам (quinolone resistance determining region, QRDR). В молекуле белка субъединицы GyrA или ParC этот регион находится в N-концевом участке домена, отвечающего за связывание с ДНК. В генах, кодирующих субъединицы GyrB и ParE, также есть подобные области, но мутации в них встречаются реже. При этом непосредственно в молекуле белка они находятся ближе к С-концу АТФазного домена. Степень устойчивости, вызванная мутациями в этих областях, различна среди разных видов и для разных хинолонов (Hooper D.C., Jacoby G.A., 2015).

Единичные мутации, которые произошли в доменах субъединиц гиразы и топоизомеразы IV, обычно не приводят к появлению полной резистентности к данному фторхинолону, а ведут к развитию устойчивости бактерий к той концентрации препарата, которая достигается при приёме терапевтической дозы лекарства, то есть наблюдается повышение минимальной подавляющей концентрации (МПК) (Hooper D.C., 2001). Более того, временное повышение устойчивости может быть результатом снижения экспрессии гена, кодирующего белок-мишень (Li X.Z., 2005).

У многих бактерий, обладающих устойчивостью к фторхинолонам, присутствуют множественные сочетанные мутации в составе генов обеих субъединиц гиразы и топоизомеразы IV (Sato T. et al., 2013). При увеличении количества мутаций происходит уменьшение спектра фторхинолонов, которые эффективны против данного мутанта, и повышение значений МПК соединений ряда фторхинолонов (Smith J.L., Fratamico P.M., 2010).

Другой причиной устойчивости бактерий к фторхинолонам может быть изменение проницаемости клеток бактерии для этих соединений. Это может быть связано с появлением мутаций в генах, продуктами которых являются регуляторные белки, контролирующие транскрипцию генов белков поринов или экскреторных помп (Hooper D.C., Jacoby G.A., 2015).

Ещё один механизм защиты, который могут использовать бактерии, это выведение вредных веществ из клетки с помощью транспортёров. Таким способом бактерии могут приобретать устойчивость к различным группам противомикробных препаратов и антибиотиков, а также к дезинфицирующим средствам (Pagedar A. et al., 2011). Для выведения фторхинолонов бактерии используют ABC-транспортёры, системы RND, MFS, MATE. При этом возможно участие сразу нескольких семейств транспортёров, способствующих повышению устойчивости, но оно ограничено количеством транспортёров на мембране (Yang S. et al., 2003). При этом зачастую совместно работают несколько средств защиты одновременно, например, может наблюдаться появление мутаций в генах субъединиц топоизомеразы IV и увеличение количества транспортёров в мембране. Данный способ развития устойчивости считается одним из самых важных, так как при ингибировании подобных экскреторных систем прекращается селекцию мутантов, устойчивых к фторхинолонам (Redgrave L.S. et al., 2014).

В некоторых случаях устойчивость к фторхинолонам связана с наличием плазмид, которые несут гены, ассоциированные с резистентностью (Hooper D.C., Jacoby G.A., 2015). Одним из таких генов является ген *qnr*, кодирующий белок, способный связываться с топоизомеразой IV и физически предотвращать взаимодействие фторхинолона с данным ферментом. При этом наличие данных генов может по-разному сказываться на повышении МПК фторхинолонов. Это объясняется различным числом копий плазмид в клетке и уровнем экспрессии гена. Ещё одним примером служит ген *aac(6')-Ib-cr*, кодирующий один из вариантов аминогликозид-ацилтрансферазы, который способен ингибировать цiproфлоксацин посредством N-ацетилирования нитрогруппы его пиперазильного кольца. Также плазмиды могут содержать гены, продуктами которых являются транспортёры, которые способны выкачивать молекулы фторхинолонов из клетки. Например, транспортёры, относящиеся к семействам MFS и RND (Smith J.L., Fratamico P.M., 2010; Kulkova N. et al., 2014; Redgrave L.S. et al., 2014). Нередко плазмиды, которые несут гены устойчивости к фторхинолонам, также несут гены, обеспечивающие устойчивость и к другим препаратам (Yanat B. et al., 2017; Jacoby G.A., 2005).

Развитие устойчивости к фторхинолонам происходит в несколько этапов. Есть промежуточная фаза, во время которой развивается фенотипическая устойчивость, проявляющаяся в увеличении МПК препарата в 1,5-2 раза. В основе её могут лежать такие процессы, как снижение активности поринов или активация систем репарации ДНК.

После этого появляются устойчивые варианты, у которых МПК возрастает в 8-16 раз. Как правило, это связано с селекцией устойчивых мутантов (Su H.C. et al., 2010).

1.4.3 Особенности развития устойчивости к фторхинолонам у представителей вида

M. hominis

Основной мишенью фторхинолонов у микоплазм является топоизомераза IV (Bebear C.M. et al., 1997), однако это характерно не для всех соединений ряда фторхинолонов. Например, первичной мишенью спарфлоксацина в клетках *M. hominis* является гираза (Hooper D.C., 1999). В целом, накопление мутаций у микоплазм идёт довольно интенсивно из-за отсутствия 3' → 5'-экзонуклеазной активности их ДНК-полимеразы, благодаря чему происходит появление и селекция устойчивых вариантов (Bebear C.M. et al., 1997). Чаще всего фиксируют замену серина и гидрофильных аминокислот на входе в активный центр белка у субъединиц GyrA и ParC, а в субъединицах GyrB и ParE обычно происходит замена аминокислот в доменах, отвечающих за связывания с ДНК. Стоит отметить, что субъединицы GyrA/ParC обычно мутируют чаще субъединиц GyrB/ParE (Bebear C.M. et al., 1997). У некоторых микоплазм наблюдаются различия в структуре субъединиц топоизомераз второго типа, что в некоторых случаях может привести к различиям в наборе мутаций и их частоте в разных субъединицах (Tagg K.A. et al., 2013; Hirose K. et al., 2004). Несмотря на то, что у *M. hominis* субъединица ParC в своём составе имеет на несколько десятков аминокислот больше, чем у других микоплазм, для неё характерны аналогичные точечные мутации: замена глутамина на глицин и серина на пролин на входе в белковый “карман” (Bebear C.M. et al., 1998; Hasegawa Y. et al., 2009). В субъединице GyrA происходит замена глутамина на лизин и серина на лейцин. Также обнаружены мутации и в субъединице ParE (Bebear C.M. et al., 1999; Gruson D. et al., 2005). Было отмечено, что при множественных мутациях имеется устойчивость к ципрофлоксацину, спарфлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину, пефлоксацину и офлоксацину (Bebear C.M. et al., 2003).

У микоплазм были выявлены системы множественной лекарственной устойчивости класса ABC. Эти системы состоят из двух трансмембранных белков, образующих канал, двух АТФ-гидролизующих белков, которые обеспечивают транспорт, и двух наружных субстрат связывающих белков. У ABC-экспортёров АТФ-связывающие субъединицы слиты с трансмембранной частью, а субстрат-связывающей нет вообще (Razin S., Herrmann R., 2002). Было описано несколько бактериальных ABC систем,

которые оказались гомологичными гликопротеину Р человека. Белки семейства ABC способны к экспорту широкого круга субстратов из клетки при помощи гидролиза АТФ (Li X.Z., Nikaido H., 2009).

В геноме *M. hominis* также есть гены, продукты которых, предположительно, отвечают за экспорт антибиотиков. В частности, были выявлены гены *md1* и *md2*, организованные в оперон, кодирующие транспортёры ABC типа, которые предположительно участвуют в выведении фторхинолонов из клетки (Razin S., Herrmann R., 2002). Так, было отмечено повышение активности этих генов у штаммов, которые обладают фенотипом с множественной устойчивостью (Raheison S. et al., 2005). Предполагаемые белки, которые являются продуктами этих генов, содержат один гидрофильный С-терминальный домен и гидрофобный N-терминальный домен. Гидрофобный домен содержит 6 предполагаемых трансмембранных сегментов, что характерно и для систем множественной устойчивости семейства ABC, найденных у других бактерий, в частности и для ABC-транспортёра *Lactococcus lactis* LmrA. В гидрофильном домене нашли АТФ-связывающий домен, включающий характерные мотивы Walker A, который отвечает за связывание нуклеотидов, и Walker B, который отвечает за гидролиз АТФ, а также ABC-мотив, что также свидетельствует о вероятной принадлежности этих белков к системам множественной устойчивости семейства ABC (Raheison S. et al., 2005). Фторхинолоны поступают в клетку пассивно, особенно при недостатке аргинина в среде. Система эффективно выводит молекулы ципрофлоксацина, но, по-видимому, неэффективна против моксифлоксацина и пефлоксацина (Raheison S. et al., 2002).

M. hominis имеет природную устойчивость в отношении многих препаратов, что значительно сужает круг возможных лекарственных средств для борьбы с ней. При этом она способна вырабатывать резистентность к соединениям, которые являются основным препаратами, используемыми при лечении болезней, связанных с ней. Так, *M. hominis* снижает их эффективность посредством мутаций в генах, продуктами которых являются ферменты-мишени, или же она не позволяет достичь им нужной концентрации внутри клетки, активируя экспортёры, которые их выкачивают. Вероятно, у *M. hominis* существуют другие способы формирования устойчивости, которые ещё до конца не изучены.

2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Были исследованы штаммы *M. hominis*, выделенные в лаборатории иммунохимических технологий Отдела новых технологий НИИ Пастера, из генитальных мазков пациентов Городского Консультативно-Диагностического Центра при клинической инфекционной больнице им. Боткина, г. Санкт-Петербург. В лаборатории штаммы хранятся в лиофилизированном состоянии.

2.2 Культивирование *M. hominis*

Для получения посевного материала лиофилизированные культуры штаммов из коллекции засеивали в стерильные пробирки, содержащие 1-2 мл селективной питательной среды МИКОПЛАЗМА-50 (ФБУН НИИ ЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург) следующего состава: PPLO-бульон, содержащий пептон, вытяжку из тканей сердца крупного рогатого скота и хлорид натрия; 10 % лошадиная сыворотка; 10 % дрожжевой экстракт; 1 % аргинин. Для определения роста *M. hominis* добавлен кислотно-основной индикатор в виде смеси фенолового красного и бриллиантового синего, который изменяет окраску среды в зависимости от pH. Затем пробирки инкубировали в течение 48 часов при 37 °С.

Для предотвращения роста других бактерий, которые присутствуют в биологическом образце, в состав среды включена смесь антибиотиков: цефтриаксон, амоксилав (амоксициллин натриевая соль/клавулановая кислота калиевая соль), ванкомицин гидрохлорид, кларитромицин, а также флуконазол для предотвращения роста грибов (О.В. Заручейнова, 2014).

2.3 Определение минимальных подавляющих концентраций

В эксперименте были использованы следующие препараты фторхинолонового ряда: офлоксацин, ломефлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин, пефлоксацин, левофлоксацин и ципрофлоксацин.

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) фторхинолонов было проведено с помощью метода серийных разведений в жидкой среде. Этот метод базируется на последовательном двукратном разведении антибиотика в жидкой питательной среде с получением диапазона необходимых концентраций. После чего полученные разведения в объеме 100 мкл вносят в лунки 96-луночного планшета и проводят лиофилизацию. В готовые планшеты вносят по 100 мкл исследуемого инокулята и затем инкубируют при условиях, оптимальных для данного микроорганизма. Для этого

эксперимента сотрудники лаборатории иммунохимических технологий Отдела новых технологий НИИ Пастера подготовили 96-луночные планшеты с вышеуказанными фторхинолонами.

Для определения МПК в лунки 96-луночных планшетов, содержащих лиофилизированные фторхинолоны с известными, последовательно убывающими концентрациями вносили по 100 мкл жидкой культуры исследуемых штаммов микоплазм. После чего добавляли по 75 мкл вазелинового масла для создания анаэробных условий и предотвращения высыхания культур и инкубировали при 37 °С в течение 2-3 дней.

Для каждого препарата был использован отдельный планшет. Последний ряд лунок не содержит фторхинолонов и является контролем роста. После внесения жидких культур конечные концентрации для офлоксацина, левофлоксацина, пефлоксацина, ципрофлоксацина и ломефлоксацина составляли 64 - 0,06 мкг/мл, а для моксифлоксацина и спарфлоксацина — 8 - 0,008 мкг/мл.

На рисунке 2 приведены схема внесения исследуемых культур в лунки 96-луночного планшета и концентрации фторхинолонов для одного варианта эксперимента.

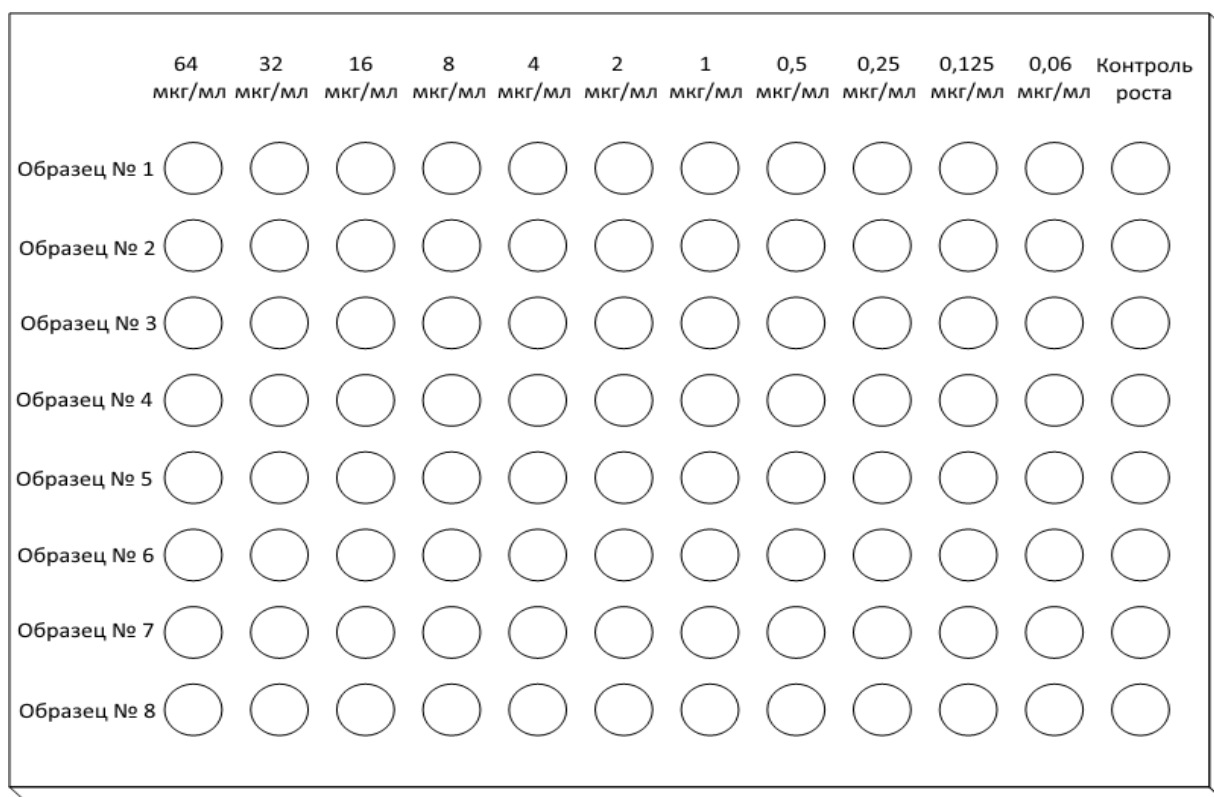


Рисунок 2. Схема посева культур в 96-луночном планшете и концентрации фторхинолонов для одного варианта эксперимента.

Оценка роста микоплазм проводилась визуально по изменению цвета питательной среды с зелёного на фиолетовый, что обеспечивается наличием рН-индикатора в среде.

2.4 Выделение ДНК

Выделение ДНК из полученных изолятов проводилось с использованием набора реагентов «М-Сорб-ООМ» для выделения ДНК (СИНТОЛ, Москва).

В пробирку объёмом 1,5 мкл (Ахуген, США) вносили 10 мкл лизирующего компонента и 500 мкл лизирующего раствора. В одну из пробирок вносили 100 мкл воды в качестве отрицательного контрольного образца выделения, а в остальные — по 100 мкл исследуемой пробы. Встряхивали пробирки на вортексе V-1 plus (BioSan, Рига, Латвия) и инкубировали в течение 15 мин при температуре 65°C. Затем пробирки помещали в штатив, охлаждали и перемешивали на вортексе V-1 plus (BioSan, Рига, Латвия). После этого центрифугировали пробирки в течение 30 с при 1677 g на центрифуге Eppendorf (Eppendorf, Германия). Добавляли в пробирки по 60 мкл сорбирующего раствора, который предварительно был перемешан с помощью вортекса V-1 plus (BioSan, Рига, Латвия), и по 400 мкл осаждающего раствора. Перемешивали пробы на вортексе V-1 plus (BioSan, Рига, Латвия) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали пробирки на центрифуге Eppendorf (Eppendorf, Германия) 15 с при 6708 g и устанавливали в магнитный штатив на 1 мин. После чего удаляли супернатант, добавляли 500 мкл промывочного раствора А и перемешивали на вортексе V-1 plus (BioSan, Рига, Латвия). Центрифугировали на центрифуге Eppendorf (Eppendorf, Германия) 30 с при 1677 g и ставили в магнитный штатив на 1 мин. Такая же последовательность действий была выполнена при использовании 500 мкл промывочного раствора В, а затем и 500 мкл промывочного раствора С. После удаления супернатанта инкубировали пробирки с открытыми крышками при температуре 65°C в течение 5 мин для удаления остатков промывочного раствора С. Добавляли по 100 мкл элюирующего раствора и перемешивали на вортексе V-1 plus (BioSan, Рига, Латвия). Инкубировали пробирки в течение 10 мин при температуре 65°C, а затем центрифугировали на центрифуге Eppendorf (Eppendorf, Германия) 30 с при 1677 g. Ставили в магнитный штатив на 1 мин, после этого переносили водную фазу, содержащую ДНК, в чистые пробирки объёмом 1,5 мкл (Ахуген, США).

2.5 Полимеразная цепная реакция

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали десятикратные разведения ДНК, выделенной из культур штаммов *M. hominis*. Для участков,

определяющих резистентность к фторхинолонам в локусах генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, были использованы специфические праймеры, синтезированные ООО «Бигль» (Санкт-Петербург) (список праймеров приведён в таблице 1). Амплификация ДНК проводилась в ПЦР-пробирках объёмом 0,2 мл (Ахуген, США). Объём пробы составлял 25 мкл, которая содержала 2 мкл ДНК изолята, по 10 пкмоль прямого и обратного праймеров, 4 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов по 2,5 ммоль каждого («ИнтерЛабСервис», Москва), 5 мкл 1X ПЦР буфера («ИнтерЛабСервис», Москва), 1 U Taq-полимеразы («ИнтерЛабСервис», Москва), 11,8 мкл воды.

ПЦР проводилась в амплификаторе Veriti (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих условиях: плавление при 94°C в течение 5 мин, затем 40 циклов с плавлением 15 с при 94°C, 15 с отжиг при 54°C, 30 с элонгация при 72°C, и элонгация цепи при 72°C в течение 5 мин.

Оценка накопления продуктов проводилась с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле с добавлением 2-3 мкл бромистого этидия (ООО «Компания Хеликон», Санкт-Петербург) в камере для горизонтального электрофореза (BioRad, США) при напряжении в 100 В в течение 20 мин. Для приготовления геля брали 1 г агарозы (ООО «Компания Хеликон», Санкт-Петербург), 100 мл 1X TAE буфера (Thermo Fisher Scientific, США).

Таблица 1. Структура праймеров, используемых для амплификации участков, определяющих резистентность к фторхинолонам.

Название праймера	Последовательность 5'→ 3'	Размер ампликона
GyrAF	ATTGAATATGCAATGAGTGTTCATAGTT	330
GyrAR	GTTGTCCATAAAGTCAACAGTATT	
GyrBF	CAACACACAAGGCTTCTTGAAATA	240
GyrBR	TAAGGCGTGAATCATTTGTTGCAAT	
ParCF	TAATGTCTGATAGATTCGGACGTT	375
ParCR	TTGGTTCGTATTCAGAGTCATCAA	
ParEF	AGACAATAAATGATTATGCTTCTAA	611
ParER	AGTAATGTTTGAATGTGAGCACCCAT	

Бромистый этидий добавляли непосредственно в гель. При нанесении проб в лунки геля их предварительно смешивали с 4X красителем, содержащим бромфенол и ксиленианол (Евроген, Москва). В качестве маркера длин ДНК использовали 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Москва). Для подготовки амплифицированных фрагментов ДНК к секвенированию электрофорез проводили в 2 % агарозном геле при напряжении 70-75 В в течение 1,5-2 часов для очистки ПЦР-продукта от различных примесей.

2.6 Выделение ДНК из геля

Выделение ДНК из геля проводили с помощью набора Diatom™ DNA Elution (ООО «Галарт-Диагностикум», Москва, Россия), который включает в себя следующий набор реагентов: Solubilizing reagent (Солюбилизирующий реагент), Saline buffer (Солевой буфер, 5-кратный), NucleoS+™ (Суспензия сорбента), ExtraGene™ E (ЭкстраГен™ E, смесь ионообменников). Из геля вырезали фрагменты, содержащие ампликоны, и помещали их в пробирки объемом 1,5 мл (Ахуген, Нью-Йорк, США). Затем добавляли 300 мкл солюбилизирующего реагента и 10-20 мкл NucleoS+. Центрифугировали в течение 10-15 с при 2414.88 g на центрифуге Eppendorf (Eppendorf, Германия). Супернатант сливали и добавляли 1 мл рабочего раствора, после чего перемешивали на вортексе V-1 plus (BioSan, Рига, Латвия) и центрифугировали в течение 10-15 с при 2414.88 g. Повторяли эту процедуру ещё раз. После удаления супернатанта инкубировали при 65 °С в термостате “Термит” (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва, Россия) до полного испарения жидкости. Добавляли 50 мкл ExtraGeneE и перемешивали на вортексе. Инкубировали пробы при 65 °С в течение 4-5 мин и снова перемешивали с помощью вортекса. Затем центрифугировали в течение 2 мин при 9659.52 g и отбирали супернатант в чистую пробирку.

2.7 Секвенирование ДНК

Двунаправленное секвенирование амплифицированного продукта было выполнено ООО "Бигль" (Санкт-Петербург) на автоматической капиллярной системе MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences, США).

2.8 Обработка данных секвенирования

Для интерпретации результатов секвенирования ДНК использовали программу BioEdit (версия 7.2.6.1; An Abbott Inc., США). При обработке были удалены концевые участки последовательностей с неточным прочтением, исправлены ошибки в нуклеотидной последовательности, которые появились в результате автоматической интерпретации пиков хроматограммы. С целью контроля качества проводили попарное

выравнивание прямой и обратной последовательностей фрагментов генов с помощью EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

Выявление мутаций проводилось при сравнении полученных последовательностей с ранее описанными последовательностями, не содержащими мутаций. В качестве референсных были взяты последовательности генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* различных штаммов *M. hominis*, представленные в базе данных GenBank: изолят 2539 (CP026341.1), штамм LBD-4 (CP009652.1), штамм ATCC 23114 (FP236530.1, X77529.1), штамм PG21 (AF036961.3, AF025688.1, U59880.2), штамм Sprott (CP011538.1), штамм AF1 (CP009677.1), штамм H-34 (Z98055.1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Сравнение проводилось с помощью алгоритма BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для множественного выравнивания полученных последовательностей использовали программу Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.9 U-критерий Уилкоксона – Манна – Уитни

U-критерий является непараметрическим статистическим критерием, который ориентирован на исследование соотношения рангов исходных вариант признака в двух независимых выборках. С помощью этого критерия можно проверить нулевую гипотезу о принадлежности двух независимых выборок к одной генеральной совокупности или к совокупностям с одинаковыми параметрами (Г.Ф. Лакин, 1990). Этот критерий рассчитывается по следующей схеме (Э.В. Ивантер, А.В. Коросов, 2010; Д.И. Марапов и др., 2013):

1. Все варианты сравниваемых совокупностей ранжируют в общем ряду, и каждому варианту присваивается ранг, порядковый номер. Каждому повторяющемуся значению вариант должен быть присвоен один и тот же средний ранг.
2. Ранги суммируют отдельно для каждой выборки. Выбирают большую из двух ранговых сумм (T_x).
3. Находят значение U-критерия по формуле:

$$U = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_x \cdot (n_x + 1)}{2} - T_x$$

n_1 - количество элементов в первой выборке, n_2 - количество элементов во второй выборке,

n_x - количество элементов выборки, которой соответствует наибольшая сумма рангов,

T_x - наибольшая сумма рангов.

4. Полученное значение сравнивают с табличным. И если полученное значение больше табличного, то нулевая гипотеза сохраняется. Если же полученное значение меньше либо равно табличному, то принимается альтернативная гипотеза, то есть существует статистическая значимость различий по вариантам признаков в сравниваемых выборках.

3. Результаты

3.1 Культивирование изолятов *M. hominis* и определение минимальной подавляющей концентрации (МПК)

В готовые 96-луночные планшеты с сорбированными в разном количестве препаратами вносили жидкие культуры исследуемых штаммов микоплазм. Для предотвращения высыхания культур и создания анаэробных условий было добавлено вазелиновое масло. Для ингибирования роста бактерий, обладающих клеточной стенкой, были добавлены антибиотики, которые нарушают синтез клеточной стенки. Также был добавлен кларитромицин, который нарушает синтез белка, но при этом не оказывает влияния на *M. hominis*. Культивирование проводили в термостате при 37°C. Контроль роста культур осуществлялся на 2-3 сутки.

Рост культуры в каждой лунке определяли по изменению цвета индикатора в питательной среде с зелёного на фиолетовый. До посева микоплазм рН среды составляет 6,95, и индикатор придаёт ей зелёную окраску. А в результате роста микоплазм накапливаются продукты метаболизма, среда защелачивается и приобретает фиолетовый цвет. На рисунке 3 приведён пример роста культур микоплазм с изменением цвета среды.

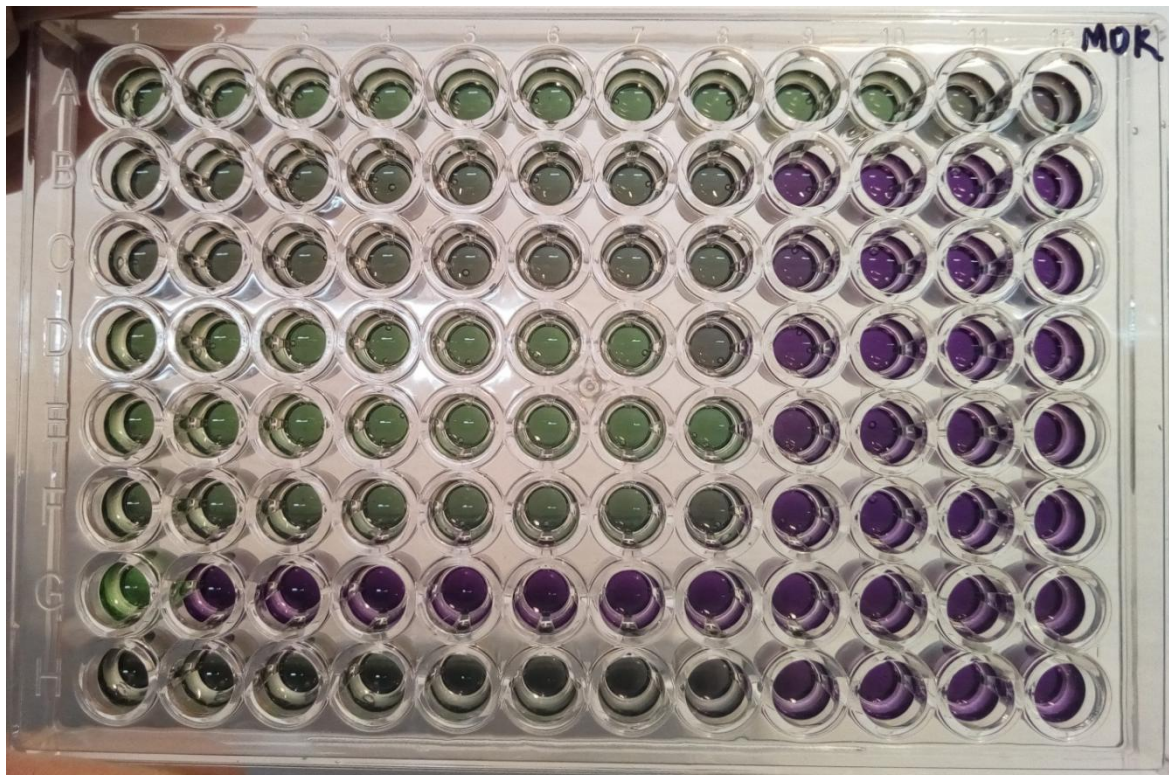


Рисунок 3. Качественный анализ оценки роста *M. hominis* на селективной питательной среде с рН-индикатором.

Для последующей работы были отобраны 10 штаммов, и данные о МПК фторхинолонов для данных штаммов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Значения МПК для выбранных штаммов *M. hominis*

Штамм	МПК соединений ряда фторхинолонов						
	Офлоксацин	Ципрофлоксацин	Спарфлоксацин	Левифлоксацин	Пефлоксацин	Моксифлоксацин	Ломефлоксацин
1367	2	1	0,125	2	2	0,06	4
465	1	1	0,03	0,5	2	0,06	2
754	4	1	0,06	2	4	0,125	4
766	1	1	0,03	0,5	2	0,125	2
81	4	2	0,25	4	8	0,125	8
648	2	1	0,06	0,5	8	0,125	2
595/К	4	1	0,5	1	8	0,06	8
576/К	8	1	0,5	4	8	0,06	8
664	8	2	0,125	1	4	0,125	8
7/24	8	2	0,125	4	4	0,125	8
МПК среднее	4,2	1,3	0,1805	1,95	5	0,099	5,4

Для того чтобы разделить изоляты на устойчивые к фторхинолонам и восприимчивые к ним, было решено использовать в качестве пороговых значений МПК среднее (см. таблица 2). Штамм с МПК больше МПК среднего считался устойчивым к соответствующему соединению, а штамм с МПК меньше порогового значения или равным ему — восприимчивым.

На основании принятого показателя устойчивости к фторхинолонам, было установлено, что среди исследованных штаммов большинство являются устойчивыми как минимум к двум препаратам. Только один штамм, 465, в изученной группе был восприимчив к воздействию всех протестированных соединений.

Наиболее часто в исследованной выборке отмечалась устойчивость к ломефлоксацину, фторхинолону II поколения, а также левофлоксацину и моксифлоксацину, которые относятся к III и IV поколениям фторхинолонов соответственно.

Число выявленных восприимчивых и устойчивых к каждому протестированному фторхинолону штаммов представлено в таблице 3.

Таблица 3. Распределение изолятов по устойчивости/восприимчивости.

Фторхинолон	Устойчивые штаммы	Восприимчивые штаммы
Офлоксацин	3	7
Ципрофлоксацин	3	7
Спарфлоксацин	3	7
Левифлоксацин	5	5
Пефлоксацин	4	6
Моксифлоксацин	6	4
Ломефлоксацин	5	5

3.2 Оптимизация ПЦР и очистка ампликонов

Для проверки эффективности протекания ПЦР для всех исследуемых генов поставили реакцию при условиях, представленных в таблице 4.

Таблица 4. Первоначальный протокол проведения ПЦР.

Стадия	Температура	Время	Количество циклов
Первоначальная денатурация	94 °С	5 мин	1
Денатурация	94 °С	15 с	40
Отжиг праймеров	55 °С	15 с	
Элонгация	72 °С	30 с	
Финальная элонгация	72 °С	5 мин	1

В результате оценки накопления продукта путём электрофореза в 1% агарозном геле было обнаружено, что реакция при данных условиях идёт для всех целевых последовательностей, кроме гена *parE*. Для решения этой проблемы было решено понизить температуру отжига с 55 до 54 °С. После повторного проведения ПЦР с пониженной температурой реакция прошла успешно.

Во всех случаях длина продукта амплификации соответствовала ожидаемой, при визуальной оценке продукта ПЦР после разделения в агарозном геле присутствия неспецифических фрагментов не отмечалось.

Для повышения качества результата секвенирования было решено проводить электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в 2% агарозном геле. Затем эти фрагменты ДНК выделяли из геля с использованием коммерческих наборов (Diatom™ DNA Elution), после чего образцы снова были секвенированы повторно. В результате удалось получить данные о структуре участков генома, в которых замены приводят к развитию устойчивости к фторхинолонам.

3.3 Анализ результатов секвенирования

Сравнение полученных последовательностей генов штаммов *M. hominis* с данными базы GenBank показало, что ряд исследуемых последовательностей содержит отличия, которых нет в ранее описанных последовательностях. Все несовпадающие нуклеотиды в каждой последовательности были проверены на возможность присутствия значимой нуклеотидной замены, которая могла быть причиной изменения аминокислотного состава. Это позволило выявить ряд мутаций, приводящих к замене одной аминокислоты на другую (таблица 5).

Таблица 5. Точечные мутации с заменой аминокислот.

Штамм	Ген	Мутация	Замена аминокислоты
1367	<i>parC</i>	431A>G	K144R Lys>Arg
754	<i>parC</i>	431A>G	K144R Lys>Arg
576/К	<i>parC</i>	296G>A	R99K Arg>Lys
664	<i>parC</i>	296G>A	R99K Arg>Lys
664	<i>gyrA</i>	350G>T	R117I Arg>Ile

Эти точечные мутации чаще всего наблюдались в гене *parC*. Например, у изолятов 1367 и 754 в этом гене произошла замена 431A>G, что привело к появлению в 144 положении аргинина вместо лизина. У изолята 664 обнаружена миссенс-мутация 350G>T в гене *gyrA*, которая привела к замене аргинина на изолейцин (R117I), а в гене *parC* есть мутация 296G>A и замена лизина на аргинин (R99K). У изолята 576/К также наблюдается аналогичная мутация 296G>A в гене *parC*.

Большинство выявленных нуклеотидных замен оказалось синонимичными мутациями, так как они не приводили к аминокислотным заменам. При этом практически во всех случаях это была замена третьего нуклеотида в кодоне. В ходе анализа нуклеотидных последовательностей были выявлены ранее неописанные молчащие нуклеотидные замены. Часть этих замен была представлена у двух и более изученных изолятов, и, вероятно, они являются распространёнными среди штаммов *M. hominis*, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга. Данные мутации представлены в таблице 6.

Таблица 6. Уникальные молчащие мутации.

Штамм	Мутация			
	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
1367	375C>T, 288A>G, 261T>A			1254T>A
465	375C>T		331C>T, 387T>C	1254T>A, 1401A>G
754	375C>T, 288A>G, 366T>C			
766	375C>T			1254T>A
81	375C>T, 288A>G	1146A>G	564T>G, 555C>T, 453A>G	
648				1254T>C, 1230T>C
595/К	366T>C, 231C>T, 234T>C, 303T>A		564T>G, 555C>T	1254T>A
576/К	375C>T			1254T>A
664	375C>T	960T>C, 1170A>T, 1176G>A, 1191T>C	327C>T, 330A>T	1254T>A

Так, в гене *parC* у семи изолятов наблюдается однонуклеотидный полиморфизм 375C>T, у трёх изолятов — 288A>G, у двух изолятов — 366T>C; в гене *gyrB* у шести изолятов однонуклеотидный полиморфизм 1254T>A; в гене *gyrA* у двух изолятов — 564T>G, 555C>T. Также были обнаружены уникальные молчащие мутации у следующих изолятов: изолят 465 имеет мутации в гене *gyrA* 331C>T, 387T>C, в гене *gyrB* 1401A>G; изолят 81 имеет мутации в гене *gyrA* 453A>G, в гене *parE* 1146A>G; изолят 595/К в гене *parC* имеет мутации 231C>T, 234T>C, 303T>A; изолят 664 имеет мутации в гене *parE* 960T>C, 1170A>T, 1176G>A, 1191T>C, в гене *gyrA* 327C>T, 330A>T; изолят 1367 имеет мутации в гене *parC* 261T>A. Последовательности, полученные в результате проделанной работы, были депонированы в базу данных GenBank под номерами, представленными в приложении №1.

3.4 Оценка связи выявленных мутаций с устойчивостью к фторхинолонам

Среди штаммов, имеющих мутации, устойчивость к фторхинолонам распределена неравномерно. Так, штамм 1367 устойчив только к одному соединению ряда фторхинолонов, 664 - к четырём фторхинолонам, 754 - к двум, а 576/К - к пяти. Чтобы определить наличие или отсутствие связи обнаруженных мутаций в генах *parC* и *gyrA* с развитием устойчивости к фторхинолонам, был применён непараметрический критерий Манна-Уитни.

При сравнении группы штаммов, несущих мутации, и группы штаммов без мутаций в ходе расчётов было получено эмпирическое значение U-критерия ($U_{\text{эмп}}$) равно 531. Было определено критическое значение U-критерия ($U_{\text{кр}}$) для уровня статистической значимости, равного 0,05 ($p=0,05$), и оно составляет 450. Следовательно, $U_{\text{эмп}}$ больше $U_{\text{кр}}$, и это означает, что данные группы не имеют статистически значимых различий.

Чтобы уточнить влияние выявленных мутаций 431A>G и 296G>A в составе *parC* на устойчивость штаммов к фторхинолонам, было проведено сравнение МПК штаммов с определённой мутацией с МПК штаммов без мутации для каждого фторхинолона. В результате данного сравнения все $U_{\text{эмп}}$ были больше $U_{\text{кр}}$. Таким образом, между данными штаммами нет статистически значимой разницы, и данные мутации не влияют на устойчивость к фторхинолонам.

4. Обсуждение

Несмотря на то, что гены, продуктами которых являются субъединицы топоизомераз второго типа, относятся к числу консервативных, они несут множество различных нуклеотидных замен, как синонимичного, так и не синонимичного характера. Такое большое количество молчащих мутаций связано с тем, что ДНК-полимераза *M. hominis* не имеет 3'→5'-экзонуклеазной активности. Это подчёркивает значительную вариабельность генома *M. hominis*, в том числе и среди изолятов одного штамма. Данные свойства микоплазмы приводят к затруднению их диагностики при использовании ПЦР, что может отрицательно сказываться на клинических исследованиях и постановке диагноза.

В ходе выполнения данной работы у штаммов, выделенных на территории Санкт-Петербурга, было найдено множество молчащих мутаций в регионе QRDR генов гиразы и топоизомеразы IV. И как уже было отмечено ранее, чаще всего мутируют гены *gyrA* и *parC*. Большинство этих мутации уже было описано, однако часть нуклеотидных замен была выявлена впервые. Помимо индивидуальных синонимичных мутаций и новых SNP можно выделить замены в генах *gyrB* и *parC*, которые являются характерной чертой пяти и более штаммов. Подобные отличия данных штаммов могут быть использованы при проведении эпидемиологических исследований.

В обнаруженных несинонимичных заменах в гене *parC* наблюдается замена аргинина на лизин и наоборот. Поскольку обе эти аминокислоты являются полярными и положительно заряженными, то такая замена, возможно, не приводит к значительным изменениям структуры субъединицы фермента и не сказывается на возможности фторхинолонов связываться с ней. Мутация, которая произошла в гене *gyrA*, кажется более существенной, так как произошла замена полярного положительно заряженного аргинина на неполярный изолейцин.

При сравнении наличия данных мутаций с устойчивостью к отдельным соединениям фторхинолонов получается следующее: штамм 1367, который имеет мутацию в гене *parC*, по результатам культивирования является устойчивым только к левофлоксацину; штамм 754 с аналогичной мутацией устойчив не только к левофлоксацину, но ещё и к офлоксацину и моксифлоксацину; штамм 576/К несёт в одной из нитей ДНК гена *parC* мутацию, при этом он является устойчивым к офлоксацину, спарфлоксацину, левофлоксацину, пefлоксацину и ломефлоксацину; штамм 664 имеет

две мутации: в гене *gyrA* и в гене *parC*, причём тоже только в одной из нитей, как и у штамма 576/К, по результатам культивирования он устойчив к офлоксацину, ломефлоксацину, ципрофлоксацину и моксифлоксацину.

Результаты культивирования в селективной среде и полученные данные по МПК показывают, что чаще всего изоляты устойчивы к офлоксацину, левофлоксацину, ломефлоксацину и моксифлоксацину. Стоит отметить тот факт, что нет строгой взаимосвязи между развитием устойчивости к препарату и его приуроченности к тому или иному поколению. Например, офлоксацин относятся к препаратам первого поколения, ломефлоксацин - к препаратам второго поколения, левофлоксацин - к препаратам третьего поколения, а моксифлоксацин - к препаратам четвёртого поколения.

Учитывая полученные данные, можно предположить, что наличие мутаций в определённых областях генов гиразы и топоизомеразы не играет ключевой роли в появлении устойчивости к соединениям ряда фторхинолонов, и переход из восприимчивого состояния в устойчивое зависит от других факторов, например, от функционирования АВС-транспортёров.

Выводы

1. В развитие устойчивости *M. hominis* к фторхинолонам помимо мутаций генов *gyrA/gyrB* и *parC/parE* вносят вклад иные факторы.
2. У *M. hominis* наиболее подвержен изменениям участок, отвечающий за устойчивость к фторхинолонам, в составе гена *parC*.
3. На территории Санкт-Петербурга распространены устойчивые варианты *M. hominis*, которые не несут мутаций в области QRDR.

Список литературы

1. Ваганова, А.Н. Молекулярные основы устойчивости патогенных для человека микоплазм к фторхинолонам // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7. Вып. 3. С. 231-244.
2. Заручейнова, О.В. Методы лабораторной диагностики урогенитальных инфекций, ассоциированных с *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4. Вып. 4. С. 331-338.
3. Ивантер, Э.В., Коросов, А.В. Элементарная биометрия: Учеб. пособие. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2010. 104 с.
4. Лакин, Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.
5. Пиневиц, А.В. Микробиология. Биология прокариотов: Учебник в 3 томах. Санкт-Петербург: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2009. Т. 3. 457 с.
6. Чарушин, В.Н., Носова, Э.В., Липунова, Г.Н., Чупахин, О.Н. Фторхинолоны: синтез и применение Москва: Физматлит, 2013. 320 с.
7. Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance // Biochemistry. 2014. Vol. 53. N 10. P. 1565-74.
8. Allen-Daniels, M.J., Serrano, M.G., Pflugner, L.P., Fettweis, J.M., Prestosa, M.A., Koparde, V.N., Brooks, J.P., Strauss, J.F., 3rd, Romero, R., Chaiworapongsa, T., Eschenbach, D.A., Buck, G.A., Jefferson, K.K. Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection // Am J Obstet Gynecol. 2015. Vol. 212. N 6. P. 779.e1-779.e13.
9. Barile, M.F., Schimke, R.T., Riggs, D.B. Presence of the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma* // J Bacteriol. 1966. Vol. 91. N 1. P. 189-92.
10. Bebear, C.M., Bove, J.M., Bebear, C., Renaudin, J. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones // Antimicrob Agents Chemother. 1997. Vol. 41. N 2. P. 269-73.
11. Bebear, C.M., Renaudin, H., Charron, A., Bove, J.M., Bebear, C., Renaudin, J. Alterations in Topoisomerase IV and DNA Gyrase in Quinolone-Resistant Mutants of *Mycoplasma hominis* Obtained In Vitro // Antimicrob Agents Chemother. 1998. Vol. 42. N 9. P. 2304-11.
12. Bebear, C.M., Charron, A., Bove, J.M., Bebear, C., Renaudin, J. Cloning and nucleotide sequences of the topoisomerase IV *parC* and *parE* genes of

- Mycoplasma hominis* // Antimicrob Agents Chemother. 1998. Vol. 42. N 8. P. 2024-31.
13. Bebear, C.M., Renaudin, H., Charron, A., Clerc, M., Pereyre, S., Bebear, C. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones // Antimicrob Agents Chemother. 2003. Vol. 47. N 10. P. 3323-5.
 14. Bebear, C.M., Renaudin, J., Charron, A., Renaudin, H., de Barbeyrac, B., Schaeverbeke, T., Bebear, C. Mutations in the *gyrA*, *parC*, and *parE* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycoplasma hominis* // Antimicrob Agents Chemother. 1999. Vol. 43. N 4. P. 954-6.
 15. Bisacchi, G.S., Hale, M.R. A “double-edged” scaffold: antitumor power within the antibacterial quinolone // Curr Med Chem. 2016. Vol. 23. N 6. P. 520-577.
 16. Blondeau, J.M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance // Surv Ophthalmol. 2004. Vol. 49 Suppl 2. P. S73-8.
 17. Boesen, T., Emmersen, J., Jensen, L.T., Ladefoged, S.A., Thorsen, P., Birkelund, S., Christiansen, G. The *Mycoplasma hominis vaa* gene displays a mosaic gene structure // Mol Microbiol. 1998. Vol. 29. N 1. P. 97-110.
 18. Collin, F., Karkare, S., Maxwell, A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives // Appl Microbiol Biotechnol. 2011. Vol. 92. N 3. P. 479-97.
 19. Diaz-Garcia, F.J., Herrera-Mendoza, A.P., Giono-Cerezo, S., Guerra-Infante, F.M. *Mycoplasma hominis* attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa // Hum Reprod. 2006. Vol. 21. N 6. P. 1591-8.
 20. Fernandes, P.B. Mode of action, and in vitro and in vivo activities of the fluoroquinolones // J Clin Pharmacol. 1988. Vol. 28. N 2. P. 156-68.
 21. Goret, J., Le Roy, C., Touati, A., Mesureur, J., Renaudin, H., Claverol, S., Bebear, C., Beven, L., Pereyre, S. Surface lipoproteome of *Mycoplasma hominis* PG21 and differential expression after contact with human dendritic cells // Future Microbiol. 2016. Vol. 11. N 2. P. 179-94.
 22. Gruson, D., Pereyre, S., Renaudin, H., Charron, A., Bebear, C., Bebear, C.M. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively // Antimicrob Agents Chemother. 2005. Vol. 49. N 3. P. 1190-3.

23. Harasawa, R., Koshimizu, K., Kitagawa, M., Asada, K., Kato, I. Nucleotide sequence of the arginine deiminase gene of *Mycoplasma hominis* // *Microbiol Immunol.* 1992. Vol. 36. N 6. P. 661-5.
24. Hasegawa, Y., Nakamura, M., Takada, T., Yamana, K. Synthesis and hybridization of oligonucleotides attached to a redox reporter via ethenyl linker at 5-position of pyrimidine base // *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2009. N 53. P. 145-6.
25. Henrich, B., Hopfe, M., Kitzerow, A., Hadding, U. The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an *opp* operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis* // *J Bacteriol.* 1999. Vol. 181. N 16. P. 4873-8.
26. Hirose, K., Kawasaki, Y., Kotani, K., Abiko, K., Sato, H. Characterization of a point mutation in the *parC* gene of *Mycoplasma bovirhinis* associated with fluoroquinolone resistance // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004. Vol. 51. N 4. P. 169-75.
27. Hooper, D.C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance // *Drug Resist Updat.* 1999. Vol. 2. N 1. P. 38-55.
28. Hooper, D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance // *Emerg Infect Dis.* 2001. Vol. 7. N 2. P. 337-41.
29. Hooper, D.C., Jacoby, G.A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance // *Ann N Y Acad Sci.* 2015. Vol. 1354. P. 12-31.
30. Hopfe, M., Deenen, R., Degrandi, D., Kohrer, K., Henrich, B. Host cell responses to persistent mycoplasmas--different stages in infection of HeLa cells with *Mycoplasma hominis* // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 1. P. e54219.
31. Jacoby, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones // *Clin Infect Dis.* 2005. Vol. 41 Suppl 2. P. S120-6.
32. Kenny, G.E., Hooton, T.M., Roberts, M.C., Cartwright, F.D., Hoyt, J. Susceptibilities of genital mycoplasmas to the newer quinolones as determined by the agar dilution method // *Antimicrob Agents Chemother.* 1989. Vol. 33. N 1. P. 103-7.
33. Khadra, A., Pinelli, E., Lacroix, M.Z., Bousquet-Melou, A., Hamdi, H., Merlina, G., Guiresse, M., Hafidi, M. Assessment of the genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the *Vicia faba* micronucleus test // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012. Vol. 76. N 2. P. 187-92.

34. Khan, S., Zakariah, M., Palaniappan, S. Computational prediction of *Mycoplasma hominis* proteins targeting in nucleus of host cell and their implication in prostate cancer etiology // *Tumour Biol.* 2016. Vol. 37. N 8. P. 10805-13.
35. Kitzerow, A., Hadding, U., Henrich, B. Cyto-adherence studies of the adhesin P50 of *Mycoplasma hominis* // *J Med Microbiol.* 1999. Vol. 48. N 5. P. 485-93.
36. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Krieg, N.R., Ludwig, W., Whitman, W., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., Brown, D., Parte, A., eds. 2nd ed.: Springer, 2010. Vol. 4: The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. 966 p.
37. Kulkova, N., Babalova, M., Brnova, J., Krcmery, V. Transferable fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hemocultures // *Cent Eur J Public Health.* 2014. Vol. 22. N 1. P. 60-3.
38. Li, X.Z. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms // *Int J Antimicrob Agents.* 2005. Vol. 25. N 6. P. 453-63.
39. Li, X.Z., Nikaido, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update // *Drugs.* 2009. Vol. 69. N 12. P. 1555-623.
40. Lupala, C.S., Gomez-Gutierrez, P., Perez, J.J. Molecular determinants of the bacterial resistance to fluoroquinolones: a computational study // *Curr Comput Aided Drug Des.* 2013. Vol. 9. N 2. P. 281-8.
41. Mayer, C., Takiff, H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiol Spectr.* 2014. Vol. 2. N 4. P. Mgm2-0009-2013.
42. Mustaev, A., Malik, M., Zhao, X., Kurepina, N., Luan, G., Oppegard, L.M., Hiasa, H., Marks, K.R., Kerns, R.J., Berger, J.M., Drlica, K. Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes: two modes of drug binding // *J Biol Chem.* 2014. Vol. 289. N 18. P. 12300-12.
43. Naeem, A., Badshah, S.L., Muska, M., Ahmad, N., Khan, K. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity // *Molecules.* 2016. Vol. 21. N 4. P. 268.
44. Pagedar, A., Singh, J., Batish, V.K. Efflux mediated adaptive and cross resistance to ciprofloxacin and benzalkonium chloride in *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin // *J Basic Microbiol.* 2011. Vol. 51. N 3. P. 289-95.

45. Parvege, M.M., Rahman, M., Hossain, M.S. Genome-wide Analysis of *Mycoplasma hominis* for the Identification of Putative Therapeutic Targets // Drug Target Insights. 2014. Vol. 8. P. 51-62.
46. Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., Charron, A., Renaudin, H., Barre, A., Avenaoud, P., Jacob, D., Couloux, A., Barbe, V., de Daruvar, A., Blanchard, A., Bebear, C. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas // PLoS Genet. 2009. Vol. 5. N 10. e1000677.
47. Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // Chem Biol. 2010. Vol. 17. N 5. P. 421-33.
48. Raheison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bebear, C., Bebear, C.M. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis* // Antimicrob Agents Chemother. 2002. Vol. 46. N 3. P. 672-9.
49. Raheison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bebear, C., Bebear, C.M. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis* // Antimicrob Agents Chemother. 2005. Vol. 49. N 1. P. 421-4.
50. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas / Razin, S., Herrmann, R., eds. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. 588 p.
51. Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A., Piddock, L.J. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success // Trends Microbiol. 2014. Vol. 22. N 8. P. 438-45.
52. Rice, L.B. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to beta-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones // Mayo Clin Proc. 2012. Vol. 87. N 2. P. 198-208.
53. Sahm, D.F., Thornsberry, C., Jones, M.E., Karlowsky, J.A. Factors influencing fluoroquinolone resistance // Emerg Infect Dis. 2003. Vol. 9. N 12. P. 1651-4.
54. Sato, T., Yokota, S., Okubo, T., Ishihara, K., Ueno, H., Muramatsu, Y., Fujii, N., Tamura, Y. Contribution of the AcrAB-TolC efflux pump to high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and humans // J Vet Med Sci. 2013. Vol. 75. N 4. P. 407-14.

55. Schimke, R.T., Berlin, C.M., Sweeney, E.W., Carroll, W.R. The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma hominis* 07 // J Biol Chem. 1966. Vol. 241. N 10. P. 2228-36.
56. Smith, J.L., Fratamico, P.M. Fluoroquinolone resistance in campylobacter // J Food Prot. 2010. Vol. 73. N 6. P. 1141-52.
57. Solomon, M., Henkel, R. Semen culture and the assessment of genitourinary tract infections // Indian J Urol. 2017. Vol. 33. N 3. P. 188-193.
58. Su, H.C., Ramkissoon, K., Doolittle, J., Clark, M., Khatun, J., Secrest, A., Wolfgang, M.C., Giddings, M.C. The development of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* involves multiple response stages and multiple proteins // Antimicrob Agents Chemother. 2010. Vol. 54. N 11. P. 4626-35.
59. Tagg, K.A., Jeffreys, N.J., Couldwell, D.L., Donald, J.A., Gilbert, G.L. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium* // J Clin Microbiol. 2013. Vol. 51. N 7. P. 2245-9.
60. Vancini, R.G., Benchimol, M. Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* // Arch Microbiol. 2008. Vol. 189. N 1. P. 7-18.
61. Waites, K.B., Schelonka, R.L., Xiao, L., Grigsby, P.L., Novy, M.J. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* // Semin Fetal Neonatal Med. 2009. Vol. 14. N 4. P. 190-9.
62. Wohlkonig, A., Chan, P.F., Fosberry, A.P., Homes, P., Huang, J., Kranz, M., Leydon, V.R., Miles, T.J., Pearson, N.D., Perera, R.L., Shillings, A.J., Gwynn, M.N., Bax, B.D. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance // Nat Struct Mol Biol. 2010. Vol. 17. N 9. P. 1152-3.
63. Yanat, B., Rodriguez-Martinez, J.M., Touati, A. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review with a focus on Mediterranean countries // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017. Vol. 36. N 3. P. 421-435.
64. Yang, S., Clayton, S.R., Zechiedrich, E.L. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli* // J Antimicrob Chemother. 2003. Vol. 51. N 3. P. 545-56.

65. Zhang, Q., Wise, K.S. Localized reversible frameshift mutation in an adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma // *Mol Microbiol.* 1997. Vol. 25. N 5. P. 859-69.
66. Zhang, Q., Wise, K.S. Coupled phase-variable expression and epitope masking of selective surface lipoproteins increase surface phenotypic diversity in *Mycoplasma hominis* // *Infect Immun.* 2001. Vol. 69. N 8. P. 5177-81.
67. EMBL-EBI.[Электронный ресурс]. URL: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
68. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
69. Марапов, Д.И., Закиров, И.К., Искандаров, И.П. "Медицинская статистика", 2013.[Электронный ресурс]. URL: <http://www.medstatistic.ru/theory/mann.html>.

Приложение 1

Номера последовательностей, депонированных в базу данных GenBank

Штамм	Ген	Регистрационный номер в GenBank
630	<i>gyrA</i>	MG654503
630	<i>gyrB</i>	MG654504
630	<i>parE</i>	MG654510
630	<i>parC</i>	MG654507
81	<i>gyrB</i>	MG654505
81	<i>parC</i>	MG654508
81	<i>parE</i>	MG654511
576/К	<i>gyrB</i>	MG654506
576/К	<i>parC</i>	MG654509
664	<i>parE</i>	MG654512
755	<i>parC</i>	MG597483
755	<i>gyrB</i>	MG597484
755	<i>parE</i>	MG597485
754	<i>gyrA</i>	MG597486
754	<i>gyrB</i>	MG597487
754	<i>parC</i>	MG597488
754	<i>parE</i>	MG597489
766	<i>parC</i>	MF981007
1367	<i>gyrB</i>	MH175516
648	<i>gyrB</i>	MH175518
648	<i>gyrA</i>	MH175517