

**М. А. Дымова¹, А. Н. Ширшова¹, Е. А. Храпов¹, У. А. Кожамкулов²,
Т. И. Петренко³, А. Г. Чередниченко³, М. Л. Филипенко¹**

¹ Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

² Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан
ул. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Республика Казахстан

³ Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза
ул. Охотская, 81 А, Новосибирск, 630040, Россия

E-mail: maya.a.rot@gmail.com

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* *

Одной из основных проблем, связанных с туберкулезом, является появление большого количества изолятов *M. tuberculosis*, устойчивых к одному или к нескольким противотуберкулезным препаратам, например изолятов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), одновременной резистентностью к изониазиду и рифампицину [1]. Ситуация усугубляется выявлением случаев с широкой лекарственной устойчивостью (XDR – extensively drug resistant), т. е. устойчивостью к изониазиду и рифампицину, фторхинолону и, по крайней мере, к одному из трех инъекционных препаратов второго ряда – канамицину, капреомицину, амикацину. Основными причинами распространения лекарственно устойчивого туберкулеза являются поздняя диагностика, неправильное или незавершенное лечение. За последнее время изучены генетические механизмы возникновения лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis*. Данные механизмы устойчивости могут быть специфическими по отношению к противотубер-

кулезному препарату или неспецифическими. У одного штамма существует несколько механизмов устойчивости, которые могут действовать независимо или одновременно для преодоления действия противотуберкулезного средства. Специфические механизмы включают разрушение лекарственного средства, инактивацию его посредством ферментативной модификации, изменение мишени для лекарственного средства, нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки, формирование метаболического «шунта». Существуют более общие механизмы лекарственной устойчивости, при которых доступ препарата к мишени предотвращается или снижается путем уменьшения его переноса в клетку или путем увеличения выведения лекарственного средства из клетки в окружающую среду (эффлюкс). Это может быть обусловлено наличием мутаций в генах, кодирующих компоненты транспортной системы. Помимо этого, необходимо указать на механизмы, которые опосредованно могут вли-

* Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 11.519.11.2013).

ять на формирование лекарственной устойчивости – это наличие мутаций в 3R-генах (репарация, репликация, рекомбинация), наличие мутаций в генах оксигеназ, супермутаза и т. д. Если первый, специфический механизм неплохо изучен, существует множество тест-систем и методов определения лекарственной устойчивости на генотипическом уровне, то второй – неспецифический – требует дальнейших исследований.

Микобактерия туберкулеза приобретает лекарственную устойчивость под действием аккумуляции мутаций, которые возникают в геноме случайно. В этот процесс не включаются ни мобильные элементы, ни плазмиды. Нуклеотидные изменения (мутация, делеция, инсерция) ведут к появлению устойчивости к одному антибиотику, а последовательная аккумуляция мутаций – к появлению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (MDR-штаммы) и с широкой лекарственной устойчивостью (XDR-штаммы). На данный момент известно несколько генов, определяющих резистентность к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП). Продукты этих генов либо являются мишенями для лекарств, либо участвуют в их активации. Мутации изменяют структуру белка и его свойства, вследствие чего лекарство перестает действовать. В данном обзоре рассмотрены молекулярные механизмы возникновения резистентности к основным противотуберкулезным препаратам.

Рифампицин – действующее вещество 3-[[[4-метил-1-пиперазинил) имино] метил] – полусинтетический антибиотик. Механизм действия рифампицина связан с подавлением ДНК-зависимой РНК-полимеразы, а именно ее β -субъединицы; таким образом, он ингибирует стадию транскрипции. Впервые молекулярную основу возникновения устойчивости к рифампицину у *M. tuberculosis* открыли A. Telenty et al. [2]. Показано, что 95 % устойчивых изолятов имеют мутации в «коровом» регионе гена *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы, размером 81 п. н. Помимо точковых нуклеотидных замен, приводящих к возникновению устойчивости к рифампицину, выделяют инсерции и делеции в «коровом регионе» гена *rpoB*. Наиболее часто мутации возникают в 531-м (Ser → Leu) и 526-м кодонах (His → Tug): в 42 и 23 % случаев соответственно [3]. Среди рифампицин-устойчивых изоля-

тов, циркулирующих в России, наибольшую частоту встречаемости имеет мутация в 531-м кодоне ($\approx 50\%$) [4]. Нуклеотидные замены в 511, 515, 516, 526-м кодонах также ассоциированы с возникновением устойчивости к рифампицину, однако частота их возникновения меньше, чем в 531-м кодоне. Это связано с пониженной относительной приспособленностью изолятов, несущих данные мутации в гене *rpoB*, по сравнению с аллелем «дикого типа» [5]. Само понятие «относительная приспособленность» отражает возможность микроорганизмов к выживанию, размножению и распространению. Это понятие включает особенности размножения микобактерии внутри человеческих макрофагов, устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды (гипоксия, отсутствие или нехватка питательных веществ) и трансмиссивность.

Помимо этого следует отметить, что существует связь между минимальной ингибирующей концентрацией и наличием мутации в «коровом» регионе. Обнаружено, что высокая степень устойчивости к рифампицину (минимально ингибирующая концентрация, МИК ≥ 50 мкг/мл) наблюдается у изолятов, в геноме которых найдены мутации в 513, 526, 531-м кодонах. Мутации в 516-м кодоне ассоциированы с более высокой степенью устойчивости (МИК ≥ 64 мкг/мл) [6]. В случае нуклеотидных замен в 514, 521, 533-м кодонах наблюдалась низкая степень устойчивости (МИК $\geq 12,5$ мкг/мл). В некоторых исследованиях получены аналогичные результаты, за исключением мутаций в His526Leu и His526Asn. В этих случаях МИК не превышали значений 8 и 16 мкг/мл соответственно. Замена Leu533Pro была ассоциирована с МИК > 32 мкг/мл. Важно, что в геноме *E. coli* замены в 526, 531, 532, 533 и 563-м кодонах дестабилизируют иницирующий комплекс на промоторе и, таким образом, блокируют транскрипцию [7].

Помимо этого, в формирование устойчивости к рифампицину вносят вклад и мембранные транспортеры MFC-семейства. В частности, показана повышенная экспрессия гена Rv1258c, кодирующего эффлюксный насос [8].

Изониазид (INH) – гидразид изоникотиновой кислоты – синтетический, бактерицидный препарат, который используется как средство первого ряда в лечении туберкуле-

за. Он проникает в микобактериальную клетку посредством пассивной диффузии. Затем изониазид активируется ферментом KatG, являющимся мультифункциональной каталазой-пероксидазой, имеющей и другие активности: пероксинитриказы и NADH-оксидазы [9]. Под действием данного фермента от изониазида отщепляется гидразин и образуется изоникотиноил радикал, который в свою очередь взаимодействует с никотинамидадениндинуклеотидом (NAD). Молекула INH-NAD ингибирует еноил-АПБ-редуктазу, кодируемую геном *inhA*, и являющуюся синтазой жирных кислот 2-го типа. Таким образом, в клетке аккумулируются длинные цепи жирных кислот, а синтез миколиевой кислоты, необходимого компонента клеточной стенки, прекращается. Помимо этого при взаимодействии изониазида с KatG образуется NO-радикал, ингибирующий ключевые ферменты дыхательной цепи.

В 90 % случаев возникновение устойчивости к изониазиду вызвано мутациями в генах *katG*, *inhA* и *ahpC*. Наиболее часто встречающаяся мутация в гене *katG* – это замена AGC → ACC в 315-й позиции (от 58 до 93 % случаев в зависимости от выборки), приводящая к аминокислотной замене Ser → Thr [1; 10]. Показано, что данная замена ведет к конформационным изменениям, а именно уменьшению размера канала для взаимодействия с окисляющим центром фермента KatG (с 6 до 4,7 Å). С помощью сайт-направленного мутагенеза выявлены еще несколько позиций, мутации в которых приводят к возникновению устойчивости к изониазиду (в 104, 108, 138, 148, 270, 275, 321-й позициях). Молекулярное конструирование белка KatG подтвердило данные результаты: аминокислоты в 104-й и 108-й позициях находятся рядом с каталитическим центром, а остатки 270, 275 и 315 – участвуют в связывании гема [11; 12]. Показано, что полной делеции гена *katG* не происходит, возможно, из-за высокой значимости пероксидазной функции для жизнеспособности клетки. N. L. Wengenack et al. [13], изучая ферментативную активность микобактерий «дикого» типа по гену *katG* и микобактерий, несущих мутацию Ser315Thr, выявили, что каталазная активность изолятов с мутантным генотипом уменьшилась в 6, а пероксидазная активность – всего в 2 раза.

Устойчивость к изониазиду, появляющаяся в результате мутаций в гене *katG*, выражается для клетки повышенной чувствительностью к пероксидазам. Возможный путь решения этой проблемы лежит в сверхэкспрессии другого детоксифицирующего фермента – алкилгидропероксидредуктазы (продукт гена *ahpC*). Данный фермент не имеет способности активировать изониазид. Таким образом, в данной модели при инактивации гена *katG* возникают мутации, приводящие к сверхэкспрессии гена *ahpC*. Кроме того, показано, что мутации в гене *inhA*, кодирующем NADH-зависимую еноил-АПБ-редуктазу, принимающую участие в биосинтезе миколиевой кислоты, также связаны с уменьшением у микобактерий чувствительности к изониазиду.

Выявлено, что у изолятов, устойчивых к изониазиду и не имеющих мутации в *katG* гене, имеются замены в опероне *inhA*, содержащем два гена (*mabA* и *inhA*) с одной общей открытой рамкой считывания. Ген *mabA* кодирует 3-кетоацил-АПБ-редуктазу, а ген *inhA* – еноил-АПБ-редуктазу. Оба белка участвуют в синтезе миколиевой кислоты. Определение белковой структуры показало, что белок InhA является NADH-зависимой еноил-АПБ-редуктазой, специфичной к длинным цепям еноил-тиозфиров. Замены в локусе *inhA* обнаружены как в промоторной части гена *mabA* в позициях 8, 15, 16, 24 выше точки трансляции, так и в кодирующей области гена *inhA* – в позициях 16, 21, 47, 78, 95, приводящие соответственно к аминокислотным заменам в NADH-связывающем сайте белка InhA [14].

Таким образом, у изолятов, устойчивых к изониазиду и не имеющих мутаций в *katG* гене, резистентность к данному антибиотику ассоциирована либо с уменьшением уровня экспрессии белка (в случае замены в промоторной части белка MabA), либо с уменьшением NADH-связывающей аффинности для еноил-редуктазы [15].

Ген *ahpC* кодирует алкилгидропероксидредуктазу, вовлеченную в клеточную регуляцию оксидативного стресса. Мутации в межгенном регуляторном регионе генов *oxyR* и *ahpC* могут уменьшать уровень экспрессии белка AhpC. Обнаружено, что у *E. coli* продукт гена *oxyR* контролирует экспрессию генов *katG*, *ahpC* и других генов. Однако аналогичные исследования показали, что у *M. tuberculosis* ген *oxyR* естествен-

но инактивирован в связи с аккумуляцией генетических повреждений, таких как смещение рамки считывания, точковые мутации и делеции, и, таким образом, он является псевдогеном [16; 17]. Следует отметить, что частота мутаций в данном межгенном регуляторном регионе мала, составляет около 4 % у изолятов, устойчивых к изониазиду [18].

В 2006 г. открыт ген *dhfr*, продукт которого (дегидрофолат-редуктаза), возможно, является мишенью для изониазида [19]. Показано, что связывание NADP изониазидом ингибирует дегидрофолат-редуктазу, являющуюся необходимой для синтеза нуклеиновой кислоты. Однако вклад мутации в данном гене в формирование устойчивости требует дальнейшего подтверждения в будущем [20].

Анализ связи между наличием той или иной мутации у INH-устойчивых изолятов и уровнем устойчивости к изониазиду показал, что высокий уровень ассоциирован с полной потерей каталазо-пероксидазной активности [21]. У данных изолятов либо был делетирован ген *katG*, либо имелся сдвиг рамки считывания, либо находили точковые замены. Также большой уровень устойчивости наблюдался в случае потери каталазной активности вследствие наличия мутаций в генах *inhA* и *ahpC*. По результатам исследования уровень устойчивости в случае наличия мутации в 315-м кодоне гена *katG* МИК ≥ 2 мкг/мл [15]. Также показано, что каталазопероксидазная активность присутствует на каком-то уровне в данных микобактериях. Действительно, с помощью сайт-направленного мутагенеза показано, что 30–40 % первоначальной каталазной активности остается у изолятов с нуклеотидными заменами в гене *katG* [22; 23].

Частота встречаемости мутаций зависит от выборки и географического региона. Для мутации в 315-м кодоне гена *katG* частота встречаемости у INH-устойчивых изолятов варьирует от 58 до 93 % [1; 10], для гена *inhA* – от 15,2 до 31,6 [24; 25], одновременные повреждения генов *katG* – *inhA* – 2,6 [2], для мутаций в межгенном регионе *oxyR-ahpC* – от 4,8 до 24,2 [26–29], ген *ahpC* – 13,2 [2] и ген *Rv1772* – 2,6 % [30].

Большинство INH-резистентных изолятов имеет нуклеотидные замены в кодоне 315 гена *katG*, что никак не отражается на уменьшении относительной приспособлен-

ности данных изолятов, их вирулентности и трансмиссивности [31]. По результатам другого эпидемиологического исследования, выявлено уменьшение количества INH-резистентных изолятов, имеющих данную замену, в группе вторично выявленных больных, что косвенно указывает на меньшую приспособленность данных изолятов [32].

Помимо ранее описанных механизмов, в формировании устойчивости к изониазиду участвуют белки-транспортёры RND-семейства, в частности белок MmpL7 [8].

Стрептомицин (STR) – это аминогликозидный антибиотик, который ингибирует белковый синтез. Ранее показано, что у *E. coli* стрептомицин связывает 16S рРНК, ингибирует инициацию трансляции, а также отрицательно влияет на точность трансляции [33]. Приблизительно в 65–75 % случаев STR-устойчивые штаммы имеют мутации в 16S рРНК гене (ген *rrs*) и *rpsL*-гене, кодирующем рибосомальный белок S12. В отличие от других бактерий, имеющих множественные копии рРНК, у *M. tuberculosis* есть только одна копия [34]; таким образом, одиночные нуклеотидные замены могут потенциально привести к формированию устойчивости. Большинство мутаций, ассоциированных с устойчивостью к STR, находят в гене *rpsL* в 43-м и 88-м кодонах. В случае замены Lys \rightarrow Arg наблюдался высокий уровень устойчивости к антибиотику (МИК > 500 мкг/мл). Низкий уровень устойчивости к STR был ассоциирован с заменой C \rightarrow G в 903-й позиции в 915-м регионе гена *rrs* (МИК = 10 мкг/мл).

Также показано, что в формировании устойчивости к стрептомицину участвует белок DtgAB, кодируемый доксорубицин-резистентным опероном (*dtgABC*), представляющий собой эффлюксный насос [8].

Пиразинамид (PZA) является структурным аналогом никотинамида и относится к препаратам первого ряда в лечении больных. Он действует бактерицидно на микобактерии туберкулеза с пониженной активностью в условиях повышенной кислотности. Предполагается, что в кислотных условиях окружающей среды (в фаголизосоме) микобактерия туберкулеза продуцирует пиразинамидазу, фермент, который переводит пиразинамид в пирозиновую кислоту, его более активный дериват [35]. У PZA-устойчивых изолятов в 72–97 % случаев делеции, инсерции или миссенс-му-

тации находят в самом гене *rncA*, а также в его промоторной части. Широкое разнообразие нуклеотидных замен в данном гене, ведущее к образованию устойчивости к PZA, можно объяснить небольшим размером белка RncA, состоящего всего из 186 аминокислотных остатков, поэтому любая аминокислотная замена может отрицательно отразиться на функции данного белка. При нахождении корреляции между мутацией и минимально ингибирующей концентрацией показан высокий уровень устойчивости к пипразинамиду в случае нахождения мутаций в 63, 138 и 14-м кодонах гена *rncA* и также в случае делеции нуклеотида в 162-й позиции (МИК > 500 мкг/мл). Отсутствие мутаций в гене *rncA* у 28 % PZA-устойчивых изолятов указывает на существование дополнительных генов, ассоциированных с устойчивостью к PZA.

Этамбутол (EMB) ингибирует встраивание миколиевой кислоты в бактериальную стенку [36; 37]. Показано, что EMB ингибирует перенос арабиногалактана на клеточную стенку у *M. smegmatis*, в результате чего в клетке накапливаются миколиевые кислоты и сложные эфиры трегалоз. Идентификация β-D-арабинофуранозил-1-монофосфодакапренола, как главного медиатора в биосинтезе арабиногалактана, и быстрое накопление других медиаторов доказало, что мишенью для EMB является арабинозил-трансфераза [38]. Данный белок в геноме *M. avium* кодирует локус, состоящий из двух генов (*embAB*), в геноме *M. smegmatis* данный предполагаемый белок кодируется тремя генами, входящими в один оперон, обозначенный как *embCAB*. Сам белок EmbCAB является интегральным мембранным белком с 12 трансмембранными доменами. Устойчивость к этамбутолу связана с определяющим этамбутол-устойчивость регионом (ERDR-EMB-resistance determining region) в белке EmbB, который находится на одной из цитоплазматических петель протеина. Далее показано, что примерно 47–50 % EMB-устойчивых изолятов имело мутацию в 306-м кодоне гена *embB* (Met306Ile или Met306Val). Также определены мутации, ассоциированные с возникновением устойчивости к EMB, и в других кодонах гена *embB* – 285, 330, 630-м. Продемонстрировано, что у изолятов, несущих мутации Met306Leu, Met306Val, Phe330Val, Thr630Ile, минимально ингибирующая концен-

трация составляет более 40 мкг/мл, в то же время для микобактерий, несущих нуклеотидную замену Met306Ile, МИК равен 20 мкг/мл. В целом, мутации в гене *embB* связаны с возникновением устойчивости к этамбутолу в 70 % случаев [39]. В дальнейшем необходимо выявить другие причины устойчивости к EMB, возможно, они будут связаны с нуклеотидными изменениями в опероне *embCAB* и с другими генами *M. tuberculosis*.

Фторхинолоны. Ципрофлоксацин и офлоксацин являются синтетическими дериватами налидиксовой кислоты, относятся к фторхинолонам (FQ) второго поколения [40]. Обычно они используются как противотуберкулезные бактерицидные препараты второго ряда при лечении больных с туберкулезом. Генетической мишенью FQ является ДНК-гираза (топоизомераза II) – гетеротетрамер, состоящий из двух субъединиц А и В, кодируемыми генами *gyrA* и *gyrB* соответственно. Предполагается, что FQ, связываясь с гиразой, ингибирует суперскручивание и, таким образом, нарушает клеточные процессы, зависящие от топологии ДНК. Показано, что FQ связывается именно с комплексом «ДНК-фермент». В результате формирования тройного комплекса «хинолон – ДНК-гираза – ДНК» прекращается не только репликация, но и транскрипция, блокируется движение РНК-полимеразы по матрице. В системе *in vitro* наблюдалось преждевременное прекращение транскрипции. С другой стороны, формирование комплекса «ингибитор – фермент – ДНК», который при этом стабилизируется, объясняя прекращение синтеза ДНК, еще не выявляет причины появления разрывов в двунитевой ДНК, что принято связывать с летальностью, т. е. бактерицидным действием фторхинолонов. Возможно, что при формировании тройных комплексов «ингибитор – фермент – ДНК» происходит индукция нуклеаз, это согласуется с тем фактом, что ингибитор транскрипции (рифампицин) и ингибитор трансляции (хлорамфеникол) снимают бактерицидность фторхинолонов. Также отмечено, что кросс-резистентность для FQ достаточно распространена [41]. FQ-устойчивые изоляты зачастую имеют устойчивость к рифампицину и другим противотуберкулезным препаратам первого ряда. Замены, ассоциированные с высокой степенью устойчивости к FQ, ак-

кумулярованы в регионе размером 40 а. к. белка GyrA, обозначенном как регион, определяющий устойчивость к хинолону (QRDR – quinolone resistance determining region). Анализ нуклеотидной последовательности гена *gyrA* и последующее его клонирование выявило наличие мутаций в 90-м и 91-м кодонах. При этом МИК ≥ 4 мкг/мл [42]. Подобное исследование на клинических изолятах установило различную степень устойчивости к FQ. Так, при мутациях в 90-м кодоне гена *gyrA* (Ala \rightarrow Val) увеличивает устойчивость к FQ в 16 раз, в то же время мутации в 94-м кодоне (Asp \rightarrow Asp, His, Tyr) приводят к увеличению устойчивости в 30, при замене (Asp \rightarrow Gly) в том же кодоне уровень устойчивости увеличивается в 60 раз [43]. В целом, мутации в регионе QRDR гена *gyrA* ассоциированы с устойчивостью к фторхинолону в 42–94 % случаев. Другие возможные механизмы устойчивости к фторхинолонам связаны с мутациями в других генах и, вероятно, приводят или к уменьшению проникновения лекарства в клетку, или связаны с активацией элиминации лекарства из клетки. В связи с увеличением количества изолятов с множественной лекарственной устойчивостью предложены новые препараты для лечения туберкулеза, например левофлоксацин, спарфлоксацин [44].

Вклад в устойчивость к фторхинолонам также вносят транспортные белки ABC-суперсемейства, обеспечивая его эффлюкс из микобактериальной клетки [8].

Препараты второго ряда – канамицин, амикацин, виомицин и капреомицин – ингибируют протеиновый синтез. Устойчивость к данным препаратам наблюдается относительно не часто в связи с редким их использованием в терапии. Выявлено, что у *M. smegmatis* устойчивость к канамицину опосредована заменой A \rightarrow G в позиции 1 389 гена *rrs* (16SpPHK) с высокой степенью устойчивости. Устойчивость к виомицину у *M. smegmatis* связана с нуклеотидными заменами в позиции 1 473 гена *rrs* (G \rightarrow A или G \rightarrow T) [45]. У микобактерии туберкулеза выявлено несколько мутаций, ассоциированных с устойчивостью к канамицину. Например, нуклеотидная замена A \rightarrow G в позиции 1 400 гена *rrs* приводит к высокой степени устойчивости к канамицину (МИК > 200 мкг/мл). Также выявлены

другие замены: в 1 483-й и 705-й позиции гена *rrs*, а также аминокислотная замена Lys \rightarrow Arg в белке RpsL. Данные исследования показывают, что у 67 % канамицин-устойчивых изолятов мутации находят в 1 400, 1 401, 1 483 позициях гена *rrs* [46].

Молекулярные методы определения лекарственной устойчивости. Определение устойчивости микобактерий классическими бактериологическими методами занимает от двух до трех месяцев, которые можно считать «потерянными» для больного. В настоящее время разработан ряд методов, применяемых для изучения наличия мутаций в исследуемых генах, ответственных за резистентность к лекарственным препаратам. Данные методы просты в исполнении, занимают 1–2 дня, показывают хорошую специфичность и чувствительность. Существует большое количество методов обнаружения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам. Опишем лишь некоторые основные подходы. Секвенирование амплифицированного фрагмента ДНК, содержащего полиморфный участок гена, ассоциированного с возникновением устойчивости к тому или иному противотуберкулезному препарату, является «золотым стандартом». Метод прямого секвенирования может дать информацию не только о наличии мутаций в данном участке ДНК, но и определить ее тип [3]. SNP-анализ и аллель специфичная ПЦР определяют уже известные нуклеотидные замены, требуют постановки дополнительных реакций и имеют все достоинства и недостатки метода ПЦР [47]. ПЦР-ПДРФ-анализ включает следующие стадии: амплификация фрагмента, содержащего полиморфизм, определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и электрофоретический анализ [24]. ПЦР в режиме реального времени, в том числе HRM-анализ, обладает серьезными преимуществами, такими как высокая специфичность и чувствительность, отсутствие возможности контаминации, быстрота. В то же время необходимо отметить высокую себестоимость метода и способность определять только уже известные мутации [48]. С помощью метода гибридизации на биочипах можно выявить одновременно сразу несколько известных мутаций за достаточно короткое время. Метод отличается простотой, быстротой исполнения, однако необходимо

отметить невысокую специфичность метода по сравнению с другими подходами [49].

В заключение отметим, что молекулярные механизмы формирования устойчивости к противотуберкулезным препаратам до конца еще не выяснены и для этого требуются дальнейшие исследования. Актуальность подобных исследований не вызывает сомнений, поскольку они имеют как фундаментальное значение для медицинской микробиологии, так и практическое значение: они представляют научный задел для создания новых более эффективных противотуберкулезных препаратов. Использование молекулярной диагностики в определении устойчивости микобактерии туберкулеза может играть решающую роль в стратегии лечения, снижении стоимости этого лечения и, опосредованно, в уменьшении количества изолятов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью.

Список литературы

1. Ramaswamy S., Musser J. M. Molecular Genetic Basis of Antimicrobial Agent Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 Update // *Tuber. Lung. Dis.* 1998. Vol. 79, № 1. P. 3–29.
2. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M. J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T. Detection of Rifampicin-resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // *Lancet.* 1993. Vol. 341 P. 647–650.
3. Musser J. M. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights // *Clin. Microbiol. Rev.* 1995. Vol. 8, № 4. P. 496–514.
4. Mokrousov I., Filliol I., Legrand E., Sola C., Otten T., Vyshnevskaya E., Limeschenko E., Vyshnevskiy B., Narvskaya O., Rastogi N. Molecular Characterization of Multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Northwestern Russia and Analysis of Rifampin Resistance Using RNA / RNA Mismatch Analysis as Compared to the Line Probe Assay and Sequencing of the RpoB Gene // *Res. Microbiol.* 2002. Vol. 153, № 4. P. 213–219.
5. Gagneux, S., Long C. D., Small P. M., Van T., Schoolnik G. K., Bohannan B. J. The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Science.* 2006. Vol. 312. P. 1944–1946.
6. Ohno H., Koga H., Kohno S., Tashiro T., Hara K. Relationship between Rifampin MICs for and RpoB Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Japan // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. Vol. 40, № 4. P. 1053–1056.
7. Zhou Y. N., Jin D. J. The RpoB Mutants Destabilizing Initiation Complexes at Stringently Controlled Promoters Behave Like «Stringent» RNA Polymerases in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95, № 6. P. 2908–2913.
8. De Rossi E., Ainsa J. A., Riccardi G. Role of Mycobacterial Efflux Transporters in Drug Resistance: an Unresolved Question // *FEMS Microbiol. Rev.* 2006. Vol. 30, № 1. P. 36–52.
9. Timmins G. S., Deretic V. Mechanisms of Action of Isoniazid // *Mol. Microbiol.* 2006. Vol. 62, № 5. P. 1220–1227.
10. Дымова М. А., Никонов С. Д., Акулиничкин А. И., Огуренко А. П., Филипенко М. Л. Преобладание *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing у больных с тяжелыми формами туберкулеза // *Вестн. Новосиб. гос. ун-та. Серия: Биология, клиническая медицина.* 2008. Т. 6, вып. 3. С. 106–109.
11. Loewen P. C., Switala J., Smolenski M., Triggs-Raine B. L. Molecular Characterization of Three Mutations in katG Affecting The Activity of Hydroperoxidase I of *Escherichia coli* // *Biochem. Cell. Biol.* 1990. Vol. 68, № 7–8. P. 1037–1044.
12. Pelletier H., Kraut J. Crystal Structure of a Complex between Electron Transfer Partners, Cytochrome C Peroxidase and Cytochrome // *Science.* 1992. Vol. 258. P. 1748–1755.
13. Wengenack N. L., Uhl J. R., Saint-Amand A. L., Tomlinson A. J., Benson L. M., Naylor S., Kline B. C., Cockerill F. R., Rusnak F. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG (S315T) is a Competent Catalase-peroxidase with Reduced Activity Toward Isoniazid // *J. Infect. Dis.* 1997. Vol. 176, № 3. P. 722–727.
14. Basso L. A., Zheng, R., Musser J. M., Jacobs W. R., Jr. Blanchard J. S. Mechanisms of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Characterization of Enoyl Reductase Mutants Identified in Isoniazid-resistant Clinical Isolates // *J. Infect. Dis.* 1998. Vol. 178, № 3. P. 769–775.
15. Dalla Costa E. R., Ribeiro M. O., Silva M. S., Arnold L. S., Rostirolla D. C., Cafrune P. I., Espinoza R. C., Palaci M., Telles M. A., Ri-

- tacco V., Suffys P. N., Lopes M. L., Campelo C. L., Miranda S. S., Kremer K., da Silva P. E., Fonseca Lde S., Ho J. L., Kritski A. L., Rossetti M. L. Correlations of Mutations in KatG, oxyR-ahpC and inhA Genes and *in vitro* Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains Segregated by Spoligotype Families from Tuberculosis Prevalent Countries in South America // BMC Microbiol. 2009. Vol. 9. P. 39–50.
16. Deretic V., Philipp W., Dhandayuthapani S., Mudd M. H., Curcic R., Garbe T., Heym B., Via L. E., Cole S. T. *Mycobacterium tuberculosis* is a Natural Mutant with an Inactivated Oxidative-stress Regulatory Gene: Implications for Sensitivity to Isoniazid // Mol. Microbiol. 1995. Vol. 17, № 5. P. 889–900.
17. Sherman D. R., Sabo P. J., Hickey M. J., Arain T. M., Mahairas G. G., Yuan Y., Barry C. E., Stover C. K. Disparate Responses to Oxidative Stress in Saprophytic And Pathogenic *mycobacteria* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92, № 14. P. 6625–6629.
18. Wilson T. M., Collins D. M. ahpC, a Gene Involved in Isoniazid Resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex // Mol. Microbiol. 1996. Vol. 19, № 5. P. 1025–1034.
19. Argyrou A., Vetting M. W., Aladegbami B., Blanchard J. S. *Mycobacterium tuberculosis* Dihydrofolate Reductase is a Target for Isoniazid // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. Vol. 13, № 5. P. 408–413.
20. Ho Y. M., Sun Y. J., Wong, S. Y., Lee A. S. Contribution of DfrA and InhA Mutations to the Detection of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. Vol. 53, № 9. P. 4010–4012.
21. Ramaswamy S. V., Reich R., Dou S. J., Jasperse L., Pan X., Wanger A., Quitugua T., Graviss E. A. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob. Agents Chemother. 2003. Vol. 47, № 4. P. 1241–1250.
22. Pym A. S., Saint-Joanis B., Cole S. T. Effect of KatG Mutations on the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the Implication for Transmission in Humans // Infect. Immun. 2002. Vol. 70, № 9. P. 4955–4960.
23. Rouse D. A., DeVito J. A., Li Z., Byer H., Morris S. L. Site-Directed Mutagenesis of the KatG Gene of *Mycobacterium tuberculosis*: Effects on Catalase-peroxidase Activities and Isoniazid Resistance // Mol. Microbiol. 1996. Vol. 22, № 3. P. 583–592.
24. Jiao W. W., Mokrousov I., Sun G. Z., Li M., Liu J. W., Narvskaya O., Shen A. D. Molecular Characteristics of Rifampin and Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Beijing, China // Chin. Med. J. 2007. Vol. 120, № 9. P. 814–819.
25. Bakonyte D., Baranauskaitė A., Ciceinaite J., Sosnovskaja A., Stakenas, P. Molecular Characterization of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Lithuania // Antimicrob. Agents Chemother. 2003. Vol. 47, № 6. P. 2009–2011.
26. Zhang M., Yue J., Yang Y. P., Zhang H. M., Lei J. Q., Jin R. L., Zhang X. L., Wang H. H. Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China // J. Clin. Microbiol. 2005. Vol. 43, № 11. P. 5477–5482.
27. Cardoso R. F., Cooksey R. C., Morlock G. P., Barco P., Cecon L., Forestiero F., Leite C. Q., Sato D. N., Shikama Mde L., Mamizuka E. M., Hirata R. D., Hirata M. H. Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. Vol. 48, № 9. P. 3373–3381.
28. Kelley C. L., Rouse D. A., Morris S. L. Analysis of ahpC Gene Mutations in Isoniazid-resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob. Agents Chemother. 1997. Vol. 41, № 9. P. 2057–2058.
29. Lee A. S., Teo A. S., Wong S. Y. Novel Mutations in Ndh in Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. Vol. 45, № 7. P. 2157–2159.
30. Wilson M., DeRisi J., Kristensen H. H., Imboden P., Rane S., Brown P. O., Schoolnik G. K. Exploring Drug-induced Alterations in Gene Expression in *Mycobacterium tuberculosis* by Microarray Hybridization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 12833–12838.
31. Cohen T., Murray M. Modeling Epidemics of Multidrug-resistant *M. tuberculosis* of Heterogeneous Fitness // Nat. Med. 2004. Vol. 10, № 10. P. 1117–1121.
32. Burgos M., DeRiemer K., Small P. M., Hopewell P. C., Daley C. L. Effect of Drug Resistance on the Generation of Secondary Cases of Tuberculosis // J. Infect. Dis. 2003. Vol. 188, № 12. P. 1878–1884.

33. Cooksey R. C., Morlock G. P., McQueen A., Glickman S. E., Crawford J. T. Characterization of Streptomycin Resistance Mechanisms Among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients in New York City // Antimicrob. Agents Chemother. 1996. Vol. 40, № 5. P. 1186–1188.
34. Bercovier H., Kafri O., Sela S. *Mycobacteria* Possess a Surprisingly Small Number of Ribosomal RNA Genes in Relation to the Size of Their Genome // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. Vol. 136, № 3. P. 1136–1141.
35. Cynamon M. H., Klemens S. P., Chou T. S., Gimi R. H., Welch J. T. Antimycobacterial Activity of a Series of Pyrazinoic Acid Esters // J. Med. Chem. 1992. Vol. 35, № 7. P. 1212–1215.
36. Takayama K., Armstrong E. L., Kunugi K. A., Kilburn J. O. Inhibition by ethambutol of Mycolic Acid Transfer into the Cell Wall of *Mycobacterium smegmatis* // Antimicrob. Agents Chemother. 1979. Vol. 16, № 2. P. 240–242.
37. Takayama K., Kilburn J. O. Inhibition of Synthesis of Arabinogalactan by Ethambutol in *Mycobacterium smegmatis* // Antimicrob. Agents Chemother. 1989. Vol. 33, № 9. P. 1493–1499.
38. Wolucka B. A., Hoffmann E. de. Recognition of the Lipid Intermediate for Arabinogalactan / Arabinomannan Biosynthesis and Its Relation to the Mode of Action of Ethambutol on *mycobacteria* // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 23328–23335.
39. Sreevatsan S., Stockbauer K. E., Pan X., Kreiswirth B. N., Moghazeh S. L., Jacobs W. R., Telenti A., Musser J. M. Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical Role of EmbB Mutations // Antimicrob. Agents Chemother. 1997. Vol. 41, № 8. P. 1677–1681.
40. Hooper D. C. Mode of Action of Fluoroquinolones // Drugs. 1999. Vol. 58, suppl. 2. P. 6–10.
41. Kocagoz T., Hackbarth C. J., Unsal I., Rosenberg E. Y., Nikaido H., Chambers H. F. Gyrase Mutations in Laboratory-selected, Fluoroquinolone-Resistant Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra // Antimicrob. Agents Chemother. 1996. Vol. 40, № 8. P. 1768–1774.
42. Takiff H. E., Salazar L., Guerrero C., Philipp W., Huang W. M., Kreiswirth B., Cole S. T., Jacobs W. R., Telenti A. Cloning and Nucleotide Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* GyrA and GyrB Genes and Detection of Quinolone Resistance Mutations // Antimicrob. Agents Chemother. 1994. Vol. 38, № 4. P. 773–780.
43. Xu C., Kreiswirth B. N., Sreevatsan S., Musser J. M., Drlica K. Fluoroquinolone Resistance Associated with Specific Gyrase Mutations in Clinical Isolates of Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // J. Infect. Dis. 1996. Vol. 174, № 5. P. 1127–1130.
44. Lounis N., Ji B., Truffot-Pernot C., Grosset J. Which Aminoglycoside or Fluoroquinolone is More Active Against *Mycobacterium tuberculosis* in mice? // Antimicrob. Agents Chemother. 1997. Vol. 41, № 3. P. 607–610.
45. Taniguchi H., Chang B., Abe C., Nikaido Y., Mizuguchi Y., Yoshida S. I. Molecular Analysis of Kanamycin and Viomycin Resistance in *Mycobacterium smegmatis* by Use of the Conjugation System // J. Bacteriol. 1997. Vol. 179, № 15. P. 4795–4801.
46. Suzuki Y., Suzuki A., Tamaru A., Katsukawa C., Oda H. Rapid Detection of Pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by a PCR-based *in vitro* System // J. Clin. Microbiol. 2002. Vol. 40, № 2. P. 501–507.
47. Espinosa de los Monteros L. E., Galan J. C., Gutierrez M., Samper S., Garcia Marin J. F., Martin C., Dominguez L., de Rafael L., Baquero F., Gomez-Mampaso E., Blazquez J. Allele-specific PCR Method Based on PncA and OxyR Sequences for Distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific *M. bovis* PncA Sequence Polymorphism // J. Clin. Microbiol. 1998. Vol. 36, № 1. P. 239–242.
48. Hazbon M. H. Recent Advances in Molecular Methods for Early Diagnosis of Tuberculosis and Drug-resistant Tuberculosis // Biomedica. 2004. Vol. 24, suppl. 1. P. 149–162.
49. Агаев Ф. Ф., Алиев К. А., Салимова Н. А., Абузаров Р. М., Гасымов И. А., Грядунов Д. А. Молекулярно-генетические и бактериологические методы диагностики *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью // Туберкулез и болезни легких. 2009. № 9. С. 32–35.